ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν Πανεπιστήμιον Αθηνών

Ιατρική Σχολή Αθηνών

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών:

¨Αναπαραγωγική & Αναγεννητική Ιατρική¨

***<u>Διπλωματική Εργασία</u>*: «Η ανίχνευση miRNAs σε γυναίκες με υπογονιμότητα. Μελέτη let-7c γονιδίου σε υπογόνιμο πληθυσμό»**

ΜΑΡΙΑ ΠΟΥΛΗΜΕΝΕΑ

Αθήνα 2019

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω την απέραντη ευγνωμοσύνη μου και αγάπη στους γονείς μου , Νίκο και Πόπη Πουλημενέα για την τόσο σημαντική στήριξή τους, οικονομική και συναισθηματική καθ'όλη την διάρκεια αυτού του μεταπτυχιακού προγράμματος, καθώς και ένα δεύτερο, μεγάλο ευχαριστώ στα αδέλφια μου και στους φίλους μου για την πίστη τους σε μένα και την μεγάλη προτροπή τους να ξεκινήσω αυτό το μεταπτυχιακό που τόσο ήθελα.

Ένα θερμό ευχαριστώ σε δύο ανθρώπους που θαυμάζω και εκτιμώ, την καθηγήτρια μου κα Δέσποινα Μαυρογιάννη για όλη την στήριξη και βοήθεια της σε αυτήν την διπλωματική καθώς και τον ενεργό της ρόλο σε ό,τι χρειάστηκα για να ολοκληρωθεί αυτή η διπλωματική και στον διδακτορικό φοιτητή Ράμι Ραουάσντε, ο οποίος αγόγγυστα ήταν δίπλα μου κατά την διάρκεια αυτής της προσπάθειας , παρέχοντας μου διαρκώς γνώσεις και εμψύχωση.

Τέλος, κλείνοντας ευχαριστώ τον κ.Λουτράδη και τον κ.Δρακάκη για την ευκαιρία που μου έδωσαν να συμμέτεχω σε αυτό το μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών «Αναπαραγωγικής – Αναγεννητικής Ιατρικής» και να μελετήσω αυτό που αγαπώ.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

II) ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Είναι γενικά παραδεκτό το γεγονός πως τα miRNAs κατέχουν και μονοπωλούν το ενδιαφέρον των ερευνητών τα τελευταία χρόνια στον τομέα της υπογονιμότητας. Αυτό δεν φαντάζει καθόλου παράλογο, αν αναλογιστεί κανείς τις δυνατότητες που φαίνεται να έχουν τόσο ως βιοδείκτες, όσο και ως θεραπευτικοί στόχοι. Αυτά τα μικρά, μη κωδικοποιητικά μόρια RNA είναι άφθονα σε πολλούς τύπους κυττάρων θηλαστικών και φαίνεται να στοχεύουν περίπου το 60% των γονιδίων ανθρώπων και άλλων θηλαστικών. Οι εφαρμογές τους στον καρκίνο, στο σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών και στην ενδομητρίωση είναι λίγα μόλις παραδείγματα, που δικαιολογούν την επιμονή της ερευνητικής κοινότητας για περαιτέρω διερεύνηση σε υπογόνιμο και μη πληθυσμό. Από τα πιο σημαντικά miRNAs είναι και η οικογένεια γονιδίων let-7, καθώς αποτελούν ένα ελκυστικό, δυνητικά θεραπευτικό μέσο για την αποτροπή της ογκογένεσης συνήθως σε καρκίνους, που υποεκφράζουν το γονίδιο let-7. Το «*νεογέννητο*» γονίδιο let-7 ανακαλύφθηκε αρχικά στο νηματοειδή σκώληκα C.*elegans* ως βασικός ρυθμιστής ανάπτυξης και αποτέλεσε μαζί με το lin-4 δύο από τα πιο γνωστά microRNAs. Οι εφαρμογές των γονιδίων της οικογένειας let-7 εντοπίζονται και στον τομέα της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, όπου γίνονται προσπάθειες εύρεσης συσχέτισης γονιδίου και ωοκυττάρων. Στόχος της παρούσας εργασίας τέθηκε η μελέτη του γονιδίου let-7c της οικογένειας let-7 των miRNAs σε γυναίκες , οι οποίες κατέφυγαν σε μεθόδους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής και η οποιαδήποτε συσχέτιση του με την υπογονιμότητα. Με την χρήση μοριακών μεθόδων σε κοκκώδη κύτταρα 25 δειγμάτων γυναικών, παρατηρήθηκε πρότυπο χαμηλής έκφρασης του υπό μελέτη γονιδίου σε γυναίκες που προσήλθαν για να υποβληθούν σε μεθόδους Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής.

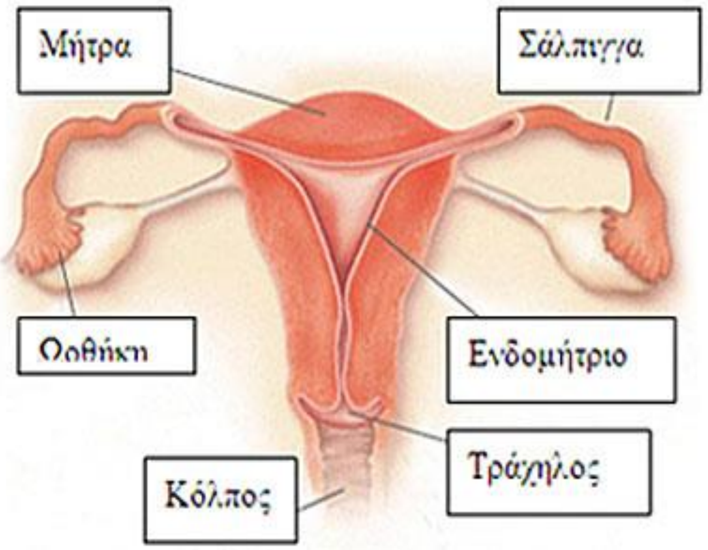
ABSTRACT

It is generally admitted that miRNAs possess the scientist's interest during the last years in the field of infertility. This fact does not seem absurd at all, considering their capability they seem to have either as biomarkers or as therapeutic targets. These small, non-coding RNA molecules are abundant in many types of mammal cells and seem to target approximately 60% of human and other mammals genes. Their application in cancer, Polycystic Ovary Syndrome (POS) and Endometriosis are only a few examples, which justify the persistence of the scientific community for further investigation in subfertile and non-subfertile population. One of the most important miRNAs is the let-7 family, as they constitute an attractive, possibly therapeutic way to prevent tumorigenesis usually in cancers which underexpress the let-7 gene. The «*newborn*» gene let-7 was initially discovered in the nematode C. *elegans* as the main development regulator and constituted, along with the lin-4 gene, two of the most known microRNAs. The applications of the let-7 family genes are identified also in the assisted reproduction field, in which attempts are taking place in order to find correlation between the gene and the oocytes. The main target that was set in this particular paper is the study of the let-7c gene of the let-7 miRNAs' family among women, who underwent Assisted Reproduction methods and whichever correlation of this gene with subfertility. By using molecular methods on cumulus cells, a low expression pattern of the le-7c gene was observed, among women who came to be undergone at Assisted Reproductive Technology methods.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Ανατομία Αναπαραγωγικού Συστήματος Θήλεος

Το γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα αποτελείται από τα έσω γεννητικά όργανα και τα έξω γεννητικά όργανα. Οι δομές της πρώτης κατηγορίας είναι δύο ωοθήκες, δύο ωαγωγοί, η μήτρα και ο κόλπος. Οι ωοθήκες είναι γεννητικοί αδένες στην άνω πυελική κοιλότητα καθένας από τους οποίους βρίσκεται δεξιά και αριστερά της μήτρας. Οι σάλπιγγες, ή αλλιώς ωαγωγοί προάγουν την μία πλευρά των ωοθηκών χωρίς να εφάπτονται σε αυτές, σχηματίζοντας τον κώδωνα ενώ η άλλη πλευρά προσκολλάται στην μήτρα και αδειάζει απευθείας στην κοιλότητα αυτής. Η μήτρα, ένα κοιλώδες όργανο με παχύ τοίχωμα βρίσκεται μεταξύ της ουροδόχου κύστεος και του ορθού εντέρου. Το χαμηλότερο μέρος της μήτρας, ο τράχηλος ενώνεται με τον κόλπο και δημιουργούν την δίοδο με το εξωτερικό περιβάλλον.



Εικόνα 1: Αναπαραγωγικό σύστημα θήλεος

Η βασική δομή της δεύτερης κατηγορίας είναι το αιδοίο, το οποίο περιλαμβάνει το εφήβαιο, τα χείλη, την κλειτορίδα, τον πρόδομο του κολεού και τους προδομικούς αδένες. Το σημείο , το οποίο συμφύονται τα ηβικά οστά ονομάζεται εφήβαιο και αποτελείται κυρίως από λιπώδη ιστό. Τα χείλη του αιδοίου είναι δερματοπτυχές και διαχωρίζονται σε μεγάλα ή έξω, που είναι το θηλυκό ομόλογο του όσχεου και σε μικρά ή έσω, τα οποία υπόκεινται στα μεγάλα. Τα μικρά χείλη σε αντίθεση με τα μεγάλα δεν έχουν λιπώδη ιστό και τριχοθυλάκια αλλά άφθονα αιμοφόρα αγγεία και σμηγματογόνους αδένες. Περιβάλλοντας την οπή της ουρήθρας και του κόλπου, σχηματίζουν τον πρόδομο του κολεού μέσα στον οποίο εκκρίνουν βλέννη οι προδομικοί ή βαρθολίνειοι αδένες. Οι τελευταίοι είναι πλούσιοι σε αδενοκυψέλες βλεννοεκκριτικών κυττάρων και εντοπίζονται στον κατώτερο κολεό. Στο εμπρόσθιο μέρος του αιδοίου βρίσκεται η κλειτορίδα, το αντίστοιχο όργανο του πέους στα θηλυκά, η οποία διαθέτει πολλές νευρικές απολήξεις και προκαλεί σεξουαλική διέγερση.[1,2]

1.1 Γυναικεία Γαμετογένεση

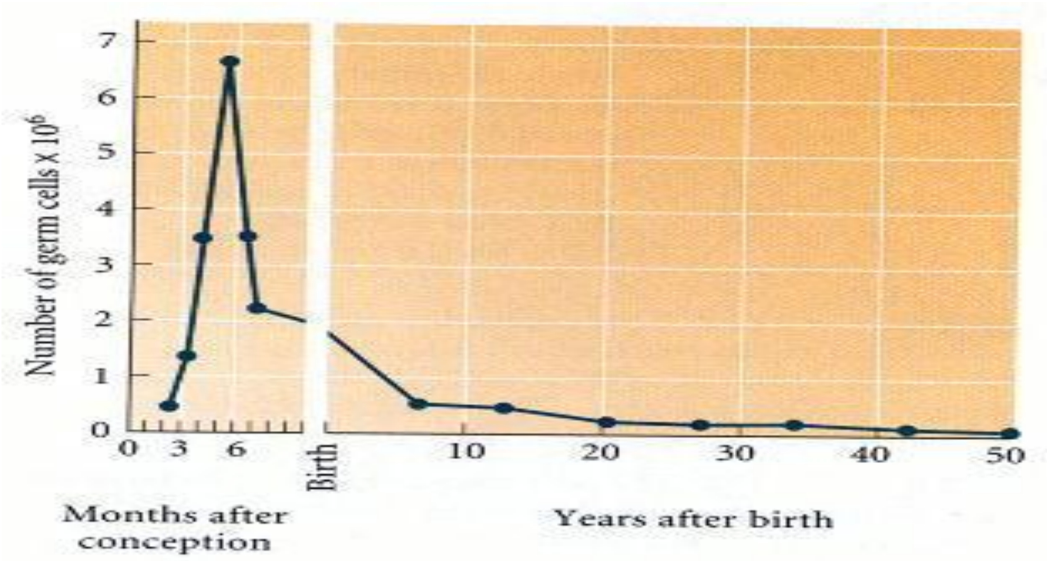
1.1.1. Ωογένεση

Όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα, οι ωοθήκες ανήκουν στα έσω γεννητικά όργανα του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος και εμφανίζουν πολλαπλό ρόλο. Η κύρια λειτουργία αυτών είναι η παραγωγή θηλυκών γαμετών (ωών) ή αλλιώς *ωογένεση* η οποία λαμβάνει χώρα πριν την γέννηση και οι δευτερεύουσες που είναι η παραγωγή στεροειδών ορμονών φύλου (οιστρογόνων, προγεστερόνης), η ρύθμιση αύξησης αναπαραγωγικών οργάνων σε μεταγεννητικό επίπεδο καθώς και η ανάπτυξη δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου. Οι τέσσερις αυτές λειτουργίες είναι άρρηκτα συνδεδεμένες μεταξύ τους και αποτελεί η μία προϋπόθεση της άλλης για την ομαλή αναπαραγωγική πορεία της γυναίκας.[1,2,3]

Σε αντίθεση με τους άρρενες , τα νεογεννηθέντα θήλυ φέρουν συγκεκριμένο αριθμό γαμετικών κυττάρων ο οποίος είναι προκαθορισμένος και αμετάβλητος. Σύμφωνα με το αναπτυξιακό πρότυπο ωαρίων στις γυναίκες, κατά την γέννηση οι ωοθήκες περιέχουν 2- 4 εκατομμύρια ωάρια πολλά από τα οποία εκφυλίζονται σε κάποιο σημείο της ανάπτυξής τους και μόνο ένα πολύ μικρό ποσοστό αυτών, υπολογίζονται γύρω στα 300 – 400 ωάρια, προχωράνε για ωορρηξία από την εφηβεία και μετά.[1]

Η ωογένεση -η διαφοροποίηση του ωαρίου διαφέρει απο την σπερματογένεση με διάφορους τρόπους. Ενώ ο γαμέτης που προκύπτει με την σπερματογένεση είναι ουσιαστικά ένας κινητός πυρήνας, ο γαμέτης που σχηματίζεται από την ωογένεση περιέχει όλα τα υλικά που χρειάζονται για την έναρξη και διατήρηση του μεταβολισμού και της ανάπτυξης. Επομένως , εκτός από τον σχηματισμό ενός απλοειδούς πυρήνα, η ωογένεση συσσωρεύει επίσης μια αποθήκη κυτταρικοπλασματικών ενζύμων, mRNAs, οργανιδίων και μεταβολικών υποστρωμάτων. Ενώ το σπέρμα, λοιπόν, διαφοροποιείται εξαιτίας της κινητικότητας, το ωάριο αναπτύσσει ένα εξαιρετικά περίπλοκο κυτταρόπλασμα. Οι μηχανισμοί της ωογένεσης διαφέρουν μεταξύ των ειδών περισσότερο από τους αντίστοιχους της σπερματογένεσης. Αυτή η διαφορά δεν αποτελεί έκπληξη, αφού τα πρότυπα αναπαραγωγής ποικίλουν τόσο μεταξύ των ειδών. Στα είδη που παράγουν χιλιάδες ωάρια, τα ωογόνια είναι αυτοανανεούμενα βλαστοκύτταρα τα οποία αντέχουν καθ’όλη την διάρκεια ζωής του οργανισμού. Στα είδη που παράγουν λιγότερα ωάρια , τα ωογόνια διαιρούνται για να σχηματίσουν έναν περιορισμένο αριθμό πρόδρομων ωοκυττάρων.

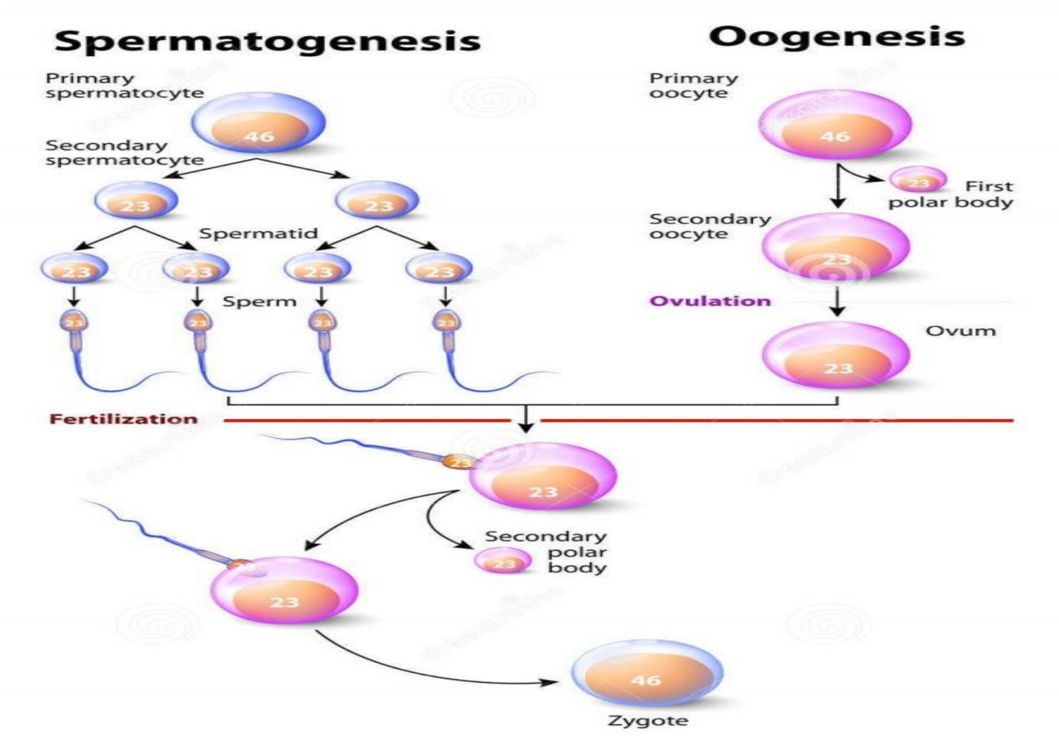
Στο ανθρώπινο έμβρυο, χιλιάδες ωογόνια διαιρούνται ταχέως από τον δεύτερο έως τον έβδομο μήνα της εγκυμοσύνης για να σχηματίσουν περίπου 7 εκατομμύρια γεννητικά κύτταρα. Μετά τον έβδομο μήνα της εμβρυϊκής ανάπτυξης ο αριθμός των γεννητικών κυττάρων πέφτει κατακόρυφα. Τα περισσότερα ωογόνια πεθαίνουν (ατρησία) κατά την διάρκεια αυτής της διαδικασίας, ενώ τα υπόλοιπα εισέρχονται στην πρώτη μειωτική διαίρεση. Αυτά τα τελευταία ονομάζονται πρωτογενή ωοκύτταρα, προχωρούν στην πρώτη μειωτική πρόφαση μέχρι το στάδιο της διπλοταίνιας και στο σημείο αυτό διατηρούνται ως την εφηβεία. Με την έναρξη της εφηβείας οι ομάδες ωοκυττάρων επαναλαμβάνουν περιοδικά την μείωση. ‘Οπως φαίνεται και στο σχήμα που ακολουθεί, τα πρωτογενή ωοκύτταρα οδηγούνται σε ατρησία ακόμα και μετά την γέννηση. Από τα εκατομμύρια πρωτογενών κυττάρων που υπάρχουν κατά την γέννηση μόνο 400 ωριμάζουν κατά την διάρκεια της ζωής μιας γυναίκας.



<u>Εικόνα 2:</u> Μεταβολές στον αριθμό γεννητικών κυττάρων κατα την διάρκεια της ανθρώπινης ζωής

Κατά την μείωση του ωοκυττάρου, ο πυρήνας του , που ονομάζεται βλαστική κυψελίδα, διασπάται και η άτρακτος της μετάφασης μεταναστεύει στην περιφέρεια του κυττάρου. Στην τελόφαση, ένα από τα δύο θυγατρικά κύτταρα δεν περιέχει σχεδόν καθόλου κυτταρόπλασμα, ενώ το άλλο περιέχει σχεδόν ολόκληρο τον όγκο των κυτταρικών συστατικών. Το μεγαλύτερο κύτταρο ονομάζεται δευτερογενές ωοκύτταρο ενώ το μικρότερο ονομάζεται πρώτο πολικό σωμάτιο και είναι ιδιαίτερα μικρό και μη λειτουργικό. Έτσι το πρωτογενές ωοκύτταρο το οποίο είναι τόσο μεγάλο όσο το ωάριο θα μεταβιβάσει στο δευτερογενές ωοκύτταρο τα μισά από τα χρωμοσώματα του αλλά σχεδόν ολόκληρο το διατροφικά πλούσιο κυτταρόπλασμα. Η δεύτερη μειωτική διαίρεση πραγματοποιείται ύστερα από ωορρηξία και μόνο αν το ωοκύτταρο γονιμοποιηθεί. Ως αποτέλεσμα της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης κάθε θυγατρικό κύτταρο λαμβάνει 23 χρωμοσώματα. Το μεγαλύτερο μέρος του κυτταροπλάσματος διατηρείται από το ώριμο ωάριο ενώ το άλλο κύτταρο είναι ένα δεύτερο πολικό σωμάτιο, μικρό πάλι και μη λειτουργικό .

Αξίζει να σημειωθεί πως διατηρείται ο όγκος του κυτταροπλάσματος των ωοκυττάρων σε ένα μόνο κύτταρο (ωάριο) αντί να χωρίζεται εξίσου μεταξύ τεσσάρων γαμετών (σπερματοζωαρίων) όπως γίνεται στην σπερματογένεση.[4]



Εικόνα 3: Σπερματογένεση – Ωογένεση

1.1.2. Ωοθυλακιογένεση

Το ωοθυλάκιο διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην διπλή λειτουργία ωρίμανσης και απελευθέρωσης του ωοκυττάρου από την ωοθήκη και στην στεροειδογένεση , η οποία απαιτείται για την ρύθμιση της ίδιας της ανάπτυξης και την παροχή κατάλληλου περιβάλλοντος στα αναπαραγωγικά όργανα για την μεταφορά των γαμετών και της εμφύτευσης.[5] Η ωοθυλακιογένεση ξεκινά με την επιστράτευση ενός πρωταρχικού ωοθυλακίου στην ομάδα των αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων και τελειώνει είτε με ωορρηξία είτε με προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο λόγω ατρησίας.[6] Η διεργασία αυτή ξεκινά από την εφηβεία και τελειώνει με την εμμηνόπαυση λόγω εξάντλησης του αποθέματος των αρχέγονων ωοθυλακίων.[7] Η ωοθυλακιογένεση, ως διαδικασία, λαμβάνει χώρο εντός του φλοιού της ωοθήκης και περιλαμβάνει τα εξής τρία στάδια:

- Στρατολόγηση
- Βασική Ωοθυλακική ανάπτυξη
- Επιλογή και Επικράτηση επικρατούντος ωοθυλακίου

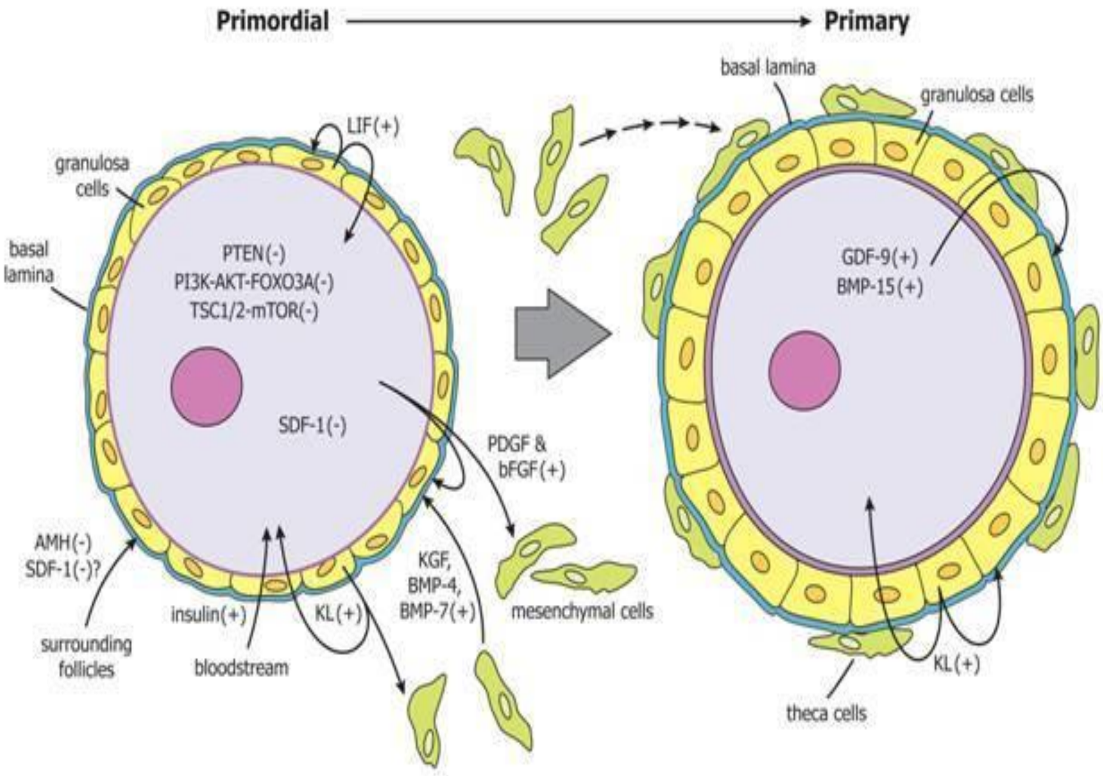
Η ανάπτυξη του ωοθυλακίου μέσα στην ωοθήκη εξαρτάται από ενδοκρινείς και παρακρινείς και άμεσης επαφής παράγοντες.[6]

Τα θυλάκια είναι ανατομικές δομές μέσα στις οποίες βρίσκονται τα ωάρια και προέρχονται από αρχέγονα θυλάκια , αποτελούμενα από πρωτογενές ωάριο και ένα μονό στρώμα κοκκιωδών κυττάρων.[1] Τα ωοθυλάκια της ανθρώπινης ωοθήκης είναι:

1. *Το αρχέγονο ωοθυλάκιο (primordial follicle)*, το οποίο θεωρείται θεμελιώδης αναπαραγωγική μονάδα των ωοθηκών καθώς πυροδοτεί την ανάπτυξη όλων των άλλων ωοθυλακίων, σε όλους τους κύκλους της έμμηνου ρύσεως. Ιστολογικά, ένα αρχέγονο ωοθυλάκιο περιέχει ένα πολύ μικρό ωοκύτταρο, διαμέτρου 25 μm, που έχει σταματήσει στο στάδιο της μείωσης και μία μονή στιβάδα αποπλατυσμένων κυττάρων που προσεγγίζουν στενά το ωοκύτταρο. Αποτελούν την δεξαμενή του αναπαραγωγικού δυναμικού της ωοθήκης και όχι αδίκως και βρίσκονται σε ανενεργή κατάσταση. Έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε ποντίκια παρουσίασαν πως ο μεταγραφικός παράγοντας FIGLA θεωρείται απαραίτητος για τον σχηματισμό αρχέγονων ωοθυλακίων. Έλλειψη αυτή της πρωτεΐνης φαίνεται να οδηγεί σε γυναικεία στειρότητα. Στοιχεία των ίδιων ερευνών επισήμαναν πως γυναίκες με πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια σχετίζεται με μεταλλάξεις τόσο στον παράγοντα FIGLA όσο και σε έναν άλλον παράγοντα, τον FOXL2, ο οποίος είναι παράγοντας μεταγραφής που εκφράζεται σε προκοκκώδη κύτταρα και απαιτείται για τον σχηματισμό αρχέγονων ωοκυττάρων.

2. *Πρωτογενές ωοθυλάκιο (primary oocyte)*, το οποίο ορίζεται από την παρουσία κυβοειδών κυττάρων, που είναι διατεταγμένα σε ένα μονό στρώμα που περιβάλλει το ωοκύτταρο. Τα κύρια αναπτυξιακά στοιχεία που εμφανίζονται στο πρωτογενές ωοθυλάκιο περιλαμβάνουν έκφραση υποδοχέα FSH, ανάπτυξη και διαφοροποίηση ωοκυττάρων. Η έκκριση της FSH επάγει την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυβοειδών κυττάρων, σχηματίζοντας ένα πολύστιβο επιθήλιο. Σε αυτό το σημείο το ωοκύτταρο αυξάνεται σε διάμετρο από 25 μm σε 120 μm και αναπτύσσει περιβάλλουσα εξωκυτταρική μήτρα, την διαφανή ζώνη (zona pellucida). Η διαφανής ζώνη διαχωρίζει το ωοκύτταρο από τα έσω κοκκιώδη κύτταρα. Παρά την υπαρξή

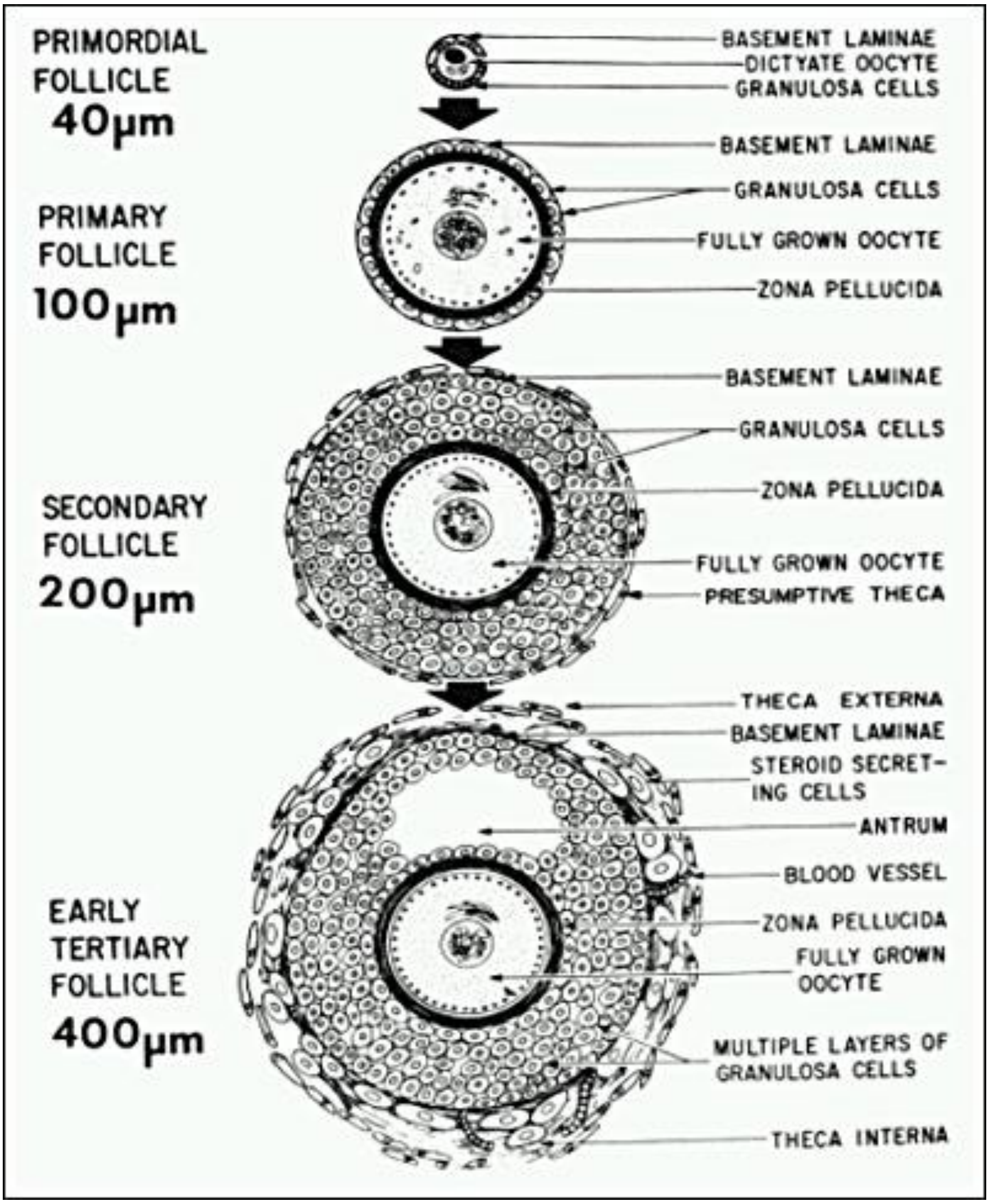
της, ωστόσο, το έσω στρώμα αυτό παραμένει σε επαφή με το ωοκύτταρο μέσω κυτταροπλασματικών προεξοχών που διασχίζουν την διαφανή ζώνη και εμφανίζουν χασματικές συνδέσεις. Μέσα από αυτές διέρχονται προς το ωοκύτταρο θρεπτικές ουσίες και χημικοί μηνυματοκομιστές. Κατά την διάρκεια της φάσης ανάπτυξης, το ωοκύτταρο είναι μεταγραφικά πολύ δραστικό καθώς πρέπει να παράγει επαρκείς πρωτεΐνες και αντίγραφα mRNa για να υποστηρίξει την δική του ανάπτυξη καθώς και μελλοντικές διεργασίες ωρίμανσης ωοκυττάρων, γονιμοποίησης και ανάπτυξης εμβρύων.



<u>Εικόνα 4</u>: Εξέλιξη αρχέγονου ωοθυλακίου σε πρωτογενές ωοθυλάκιο

3. *Δευτερογενές ωοθυλάκιο (sencondary oocyte)*, εδώ καθώς η ανάπτυξη του ωοθυλακίου συνεχίζεται, αλλάζει η δομή του. Οι κύριες αλλαγές περιλαμβάνουν τη συσσώρευση αυξημένων αριθμών κοκκωδών κυττάρων που σχηματίζουν πολλαπλά στρώματα γύρω από το ωοκύτταρο και την ανάπτυξη μιας θήκης, αποτελούμενης απο 2 στιβάδες (έσω – έξω) . Η ανάπτυξη ενός πρωτογενούς σε ένα πλήρως ανεπτυγμένο δευτερογενές ωοθυλάκιο προκύπτει από μια ενεργή αυτοκρινή/παρακρινή διαδικασία που περιλαμβάνει αυξητικούς παράγοντες που παράγονται από το ωοκύτταρο. Η δευτερογενής ανάπτυξη των ωοθυλακίων περιλαμβάνει μια αλλαγή στην διάταξη των κοκκωδών κυττάρων από ένα απλό κυβοειδές επιθήλιο σε μια στρωματοποιημένη στήλη επιθηλίου. Η έσω θήκη αποτελείται κυρίως από μία αγγειοβριθή κυτταρική στιβάδα ενώ η έξω θήκη από ινώδη συνδετικό ιστό, ως επί το πλείστον. Τα κύτταρα της έσω θήκης διαθέτουν υποδοχείς LH στην κυτταρική μενβράνη τους . Κατά την ολοκλήρωση της δευτερογενής φάσης, έχουμε ένα πλήρως ανεπτυγμένο δευτερογενές ωοθυλάκιο με πολλές στιβάδες κοκκιωδών κυττάρων μέσα στα οποία σχηματίζονται μεσοκυττάριοι χώροι με θυλακικό υγρό. Οι μεσοκυττάριοι χώροι συνενώνονται μεταξύ τους σε μια κοιλότητα, το άντρο. Αυτό το υγρό, που διαθέτουν, περιέχει προγεστερόνη, οιστραδιόλη, ινχιμπίνη, ακτιβίνη αλλά και πολλές πρωτεογλυκάνες και γλυκοζαμινογλυκάνες.

4. *Τριτογενές ή Γρααφιανό Ωοθυλάκιο*, είναι απόρροια του συνεχιζόμενου πολλαπλασιασμού των κοκκιωδών κυττάρων καθώς και του συνεχιζόμενου σχηματισμού θυλακικού υγρού. Η διάμετρος του φτάνει περίπου τα 2,5 cm και μιλάμε πια για ένα ώριμο, γρααφιανό ωοθυλάκιο το οποίο προορίζεται για ωοθυλακιορρηξία. Καθώς το κυρίαρχο ωοθυλάκιο μεγεθύνεται, εξαιτίας της διόγκωσης του άντρου, τα στρώματα των κοκκιωδών κυττάρων σχηματίζουν τον ωοφόρο δίσκο του ωοθυλακίου, ο οποίος αποδευσμεύεται από το τοίχωμα του ωοθυλακίου, όσο πλησιάζει η ωορρηξία, με αποτέλεσμα το ωοκύτταρο να επιπλέει ελεύθερα στο υγρό του άντρου.[1,2,3,6]



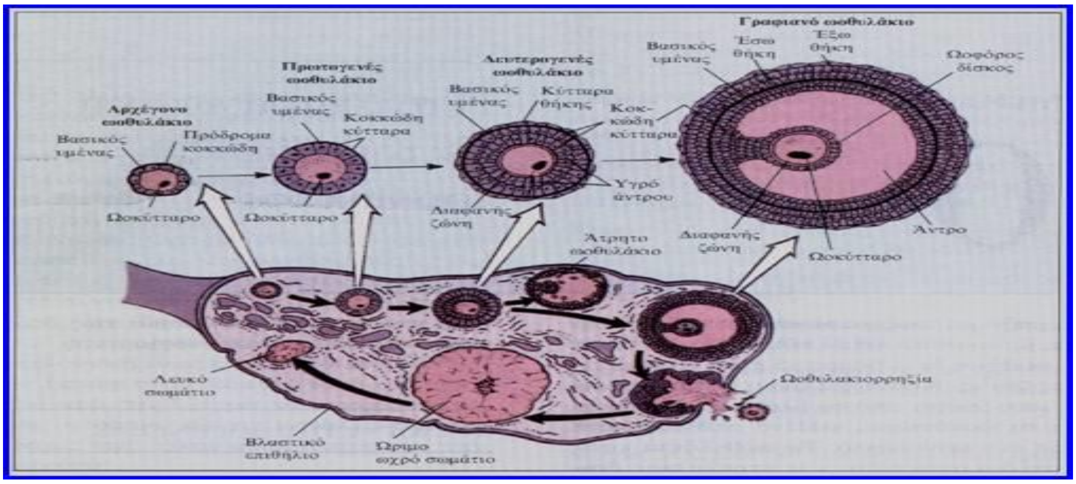
<u>Εικόνα 5:</u> Η πρώιμη διαφοροποίηση των κοκκωδών κυττάρων στα διάφορα στάδια της ωοθυλακιογένεσης

Στα θηλαστικά, το 99,9% των ωοθυλακίων πεθαίνουν από ατρησία. Μια θεμελιώδης ιδιότητα της ατρησίας είναι η ενεργοποίηση της απόπτωσης των κοκκωδών κυττάρων και των ωοκυττάρων. Η απόπτωση είναι μια σύνθετη διεργασία που περιλαμβάνει μονοπάτια σηματοδότησης συζευγμένα με προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Μπορεί να ξεκινήσει , εξωγενώς , με δέσμευση προσδέματος σε σηματοδότηση κυτταρικής επιφάνειας “υποδοχέα θανάτου” ή μέσω ενδογενών οδών κυτταρικού θανάτου, που προκαλούνται από αλλοιώσεις της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής εξωτερικής μεμβράνης, που προκαλούν απελευθέρωση προ – αποπτωτικών παραγόντων στο κυτταρόπλασμα.[6]

ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΩΧΡΟΥ ΣΩΜΑΤΙΟΥ ΚΑΙ ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΓΕΝΕΣΗ

Την 14η ημέρα ενός εξιδανεικευμένου, εμμηνορρυσιακού κύκλου το προωοθυλακιορρηκτικό θυλάκιο απελευθερώνει ένα ώριμο ωάριο που περικλείεται εντός ενός συμπλέγματος κοκκωδών κυττάρων για πιθανή γονιμοποίηση. Αυτή η διαδικασία, που ονομάζεται ωορρηξία, απαιτεί τις συλλογικές δράσεις του ενδοκρινικού συστήματος, των ανοσοποιητικών σημάτων και των ενδοωοθηκικών, παρακρινικών παραγόντων. Τα οιστρογόνα, που παράγονται κυρίως, από το γρααφιανό ωοθυλάκιο, την 14η ημέρα του κύκλου αυξάνουν τα επίπεδα οιστρογόνων στο αίμα με αποτέλεσμα να εκλύεται ένα αιφνίδιο κύμα LH από τα βασεόφιλα κύτταρα της πρόσθιας υπόφυσης και να σταματά η έκκριση της FSH. Η αύξηση των επιπέδων LH προκαλεί αύξηση ροής αίματος στις ωοθήκες και εκροή πλάσματος που δημιουργεί την παρουσία οιδήματος. Αξίζει δε να τονιστεί, ότι η νεοσχηματισματισμένη πλασμίνη, που προκύπτει από την μετατροπή πλασμινογόνου, βοηθά την πρωτεόλυση της κοκκιωδούς στιβάδας και έτσι πραγματοποιείται η ωοθυλακιορρηξία. Ο εμμηνορρυσιακός κύκλος συμβαίνει κάθε μήνα και έχει μέση διάρκεια 28 ημέρες. Ωστόσο, αν και σε κάποιες γυναίκες κάποιοι κύκλοι είναι μεγαλύτεροι ή μικρότεροι η ωορρηξία πραγματοποιείται την 14η ημέρα του κύκλου πριν από την έναρξη της εμμηνορρυσίας .[8,9]

Το ωχρό σωμάτιο (corpus luteum) προκύπτει από τα υπολλείματα του γρααφιανού ωοθυλακίου και αποτελεί ενδοκρινή αδένα, ο οποίος εκκρίνει ορμόνες απαραίτητες για την καλή συντήρηση του ενδομητρίου. Αποτελείται από κοκκιώδη – ωχρινικά και από θηκικά – ωχρινικά κύτταρα. Είναι ένας σημαντικός παράγοντας στεροειδών ορμονών, ιδιαίτερα της προγεστερόνης και καθοριστικός για την διατήρηση της πρώιμης εγκυμοσύνης. Η δυσλειτουργία της ωχρινικής φάσης μπορεί να οδηγήσει σε πρόωρη υποχώρηση του αδένα, με επακόλουθη μετατόπιση σε έναν στείρο κύκλο. Η κατανόηση του μηχανισμού στεροειδογένεσης κατά την διάρκεια ανάπτυξης και παλινδρόμησης ωχρού σωματίου είναι κρίσιμη για την αξιολόγηση της φυσιολογικής φυσιολογίας και της παθοφυσιολογίας των αναπαραγωγικών κύκλων. Λόγω της μοναδικής σημασίας που έχει για μια επιτυχημένη εγκυμοσύνη, τα θηλαστικά έχουν αναπτύξει μια περίπλοκη σειρά ελέγχων και ισορροπιών που διατηρούν την προγεστερόνη σε κατάλληλα επίπεδα καθ΄ όλη την διάρκεια της κύησης. Ο σχηματισμός, η διατήρηση, η παλινδρόμηση και η στεροειδογένεση του ωχρού σωματίου είναι από τα πιο σημαντικά και άρρηκτα συνδεόμενα συμβάντα στην ανθρώπινη αναπαραγωγή. Κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης , η τύχη του ωχρού σωματίου εξαρτάται από την αλληλεπίδραση ωοθηκικών, υποφυσιακών και πλακουντιακών ρυθμιστών. Στο τέλος της διάρκειας ζωής του, το ωχρό σωμάτιο υφίσταται μια διαδικασία παλινδρόμησης, που οδηγεί στην εξαφάνιση του από τις ωοθήκες, επιτρέποντας την έναρξη νέου κύκλου. Καθώς το ωχρό σωμάτιο εκφυλίζεται και φαγοκυτταρώνεται από τα μακροφάγα κύτταρα, ινοβλάστες εισέρχονται σε αυτό και σχηματίζουν το λευκό σωμάτιο.[8,9]



<u>Εικόνα 6</u>: Απεικόνιση της δομής της ωοθήκης, όπου διακρίνονται τα διάφορα στάδια ανάπτυξης του ωοθυλακίου και του ωχρου σωματίου.

Ο καταμήνιος κύκλος αποτελείται από δύο φάσεις : την *θυλακική*, σύμφωνα με την οποία έχουμε ένα ώριμο ωοθυλάκιο και ένα δευτερογενές ωοκύτταρο και την *ωχρινική*, η οποία ξεκινά μετά την ωορρηξία και τελειώνει με το θάνατο του ωχρού σωματίου. Η θυλακική φάση ξεκινά από την πρώτη ημέρα της έμμηνου ρύσεως και διαρκεί μέχρι και την ωορρηξία ($14^{η}$ ημέρα του κύκλου). Εδώ, η έκκριση οιστρογόνων γίνεται από τα κοκκώδη κύτταρα, ύστερα όμως από την ωορρηξία (ωχρινική φάση), τα οιστρογόνα εκκρίνονται από το ωχρό σωμάτιο. Κατά την διάρκεια της θυλακικής φάσης , η FSH εκκρίνεται από την υπόφυση και η συνεχόμενη έκκριση της οδηγεί στην στρατολόγηση ωοθυλακίων , εκ των οποίων θα επιλεχθεί ως κυρίαρχο. Η επιλογή του κυρίαρχου ωοθυλακίου θα πραγματοποιηθεί την $5^{η}$ - $7^{η}$ ημέρα του κύκλου. Τα υπόλοιπα ωοθυλάκια θα υποστραφούν και θα οδηγηθούν σε ατρησία ενώ αυτό που έχει καταφέρει να κυριαρχήσει θα φτάσει σε ωορρηξία.

Αξίζει να σημειωθεί πώς η FSH αυξάνεται στο πρώιμο στάδιο της θυλακικής φάσης και ακολουθεί σταθερή μείωση με εξαίρεση μια μικρή κορύφωση στον μέσον του κύκλου. Η συγκέντρωση της LH είναι σταθερή κατά την διάρκεια της θυλακικής φάσης αλλά ανυψώνεται σε μεγάλο βαθμό 18 ώρες πριν την ωορρηξία και έχουμε το λεγόμενο παλιρροιακό κύμα της LH. Η συγκέντρωση των οιστρογόνων διατηρείται σταθερά χαμηλή κατά την πρώτη εβδομάδα της θυλακικής φάσης και αρχίζουν να αυξάνονται ραγδαία κατά την δεύτερη εβδομάδα , καθώς παράλληλα έχουμε αύξηση και των ωοθυλακίων. Μετά την αιχμή της LH, τα οιστρογόνα αρχίζουν να μειώνονται και η μείωση ακολουθείται από μία δεύτερη ανύψωση η οποία οφείλεται στην έκκριση του ωχρού σωματίου. Κατά την θυλακική φάση η προγεστερόνη εκκρίνεται από τις ωοθήκες σε μικρές ποσότητες ενώ κατά την ωχρινική φάση η έκκριση γίνεται από το ωχρό σωμάτιο σε πολύ μεγαλύτερες.[3,8,9]

1.2. Κοκκώδη κύτταρα

Τα κοκκώδη κύτταρα αποτελούν αναπόσπαστο στοιχείο των ωοθυλακίων και εκκρίνουν σημαντικές στεροειδείς ορμόνες όπως είναι η προγεστερόνη και η οιστραδιόλη. Ορίζονται ως μια ομάδα στενά συνδεδεμένων κυττάρων, που περιβάλλουν το ωοκύτταρο και συμμετέχουν στις διαδικασίες ωρίμανσης και γονιμοποίησης αυτού.

Η λειτουργία τους εξαρτάται από τις διακλαδώσεις που σχηματίζονται μεταξύ των κοκκωδών κυττάρων και των ωοκυττάρων. Οι χασμοσυνδέσεις (gap junctios) σχηματίζονται από συσσωματώματα διακυτταρικών πρωτεϊνών διαύλου μεμβράνης που ονομάζονται κονεξίνες (connexines) , οι οποίες είναι μέλη μιας ομόλογης οικογένειας με περισσότερες από 20 πρωτεΐνες και οι οποίες επιτρέπουν την ανταλλαγή μικρών μορίων μεταξύ γειτονικών κυττάρων.

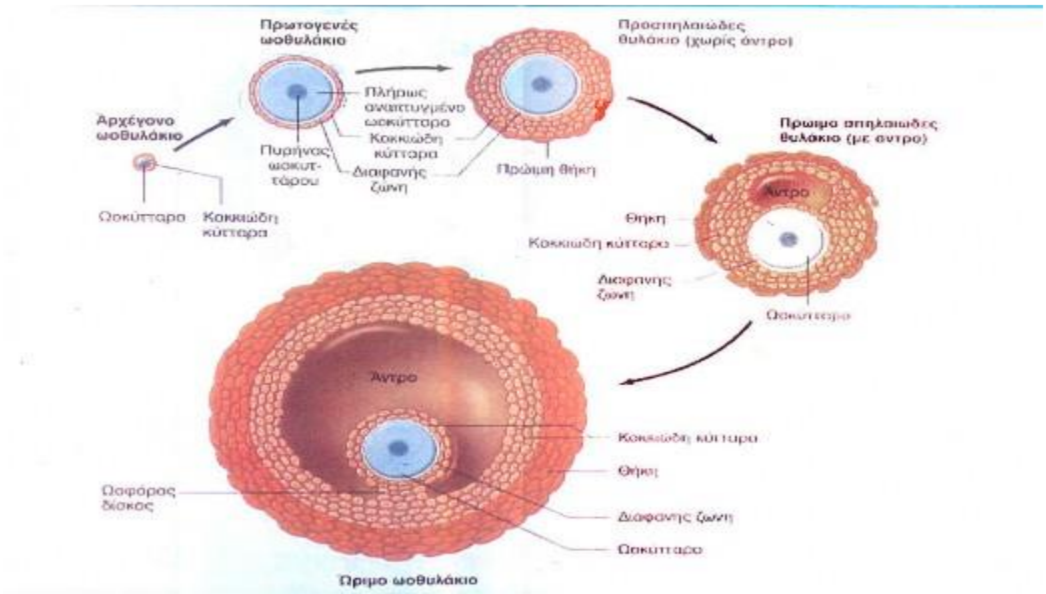
Η κυτταρική επικοινωνία είναι ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα του συμπλέγματος κοκκύτη-ωοκυττάρου, και αυτή η επικοινωνία τερματίζεται κοντά στον χρόνο της ωορρηξίας. Αυτό το χρονικό σχέδιο του τερματισμού της επικοινωνίας μεταξύ των κοκκωδών κυττάρων (cumulus cells) και του ωοκυττάρου μπορεί να υποδεικνύει ότι η επικοινωνία παρέχει ένα μηχανισμό για τη ρύθμιση της ωρίμανσης του ωοκυττάρου κατά τη διάρκεια ανάπτυξης ωοθυλακίων πριν από την ωορρηξία. Ενεργό ρόλο έχουν τα κοκκώδη κύτταρα και στον σχηματισμό και την λειτουργία του ωχρού σωματίου. Τα κοκκώδη, τέλος, επικοινωνούν με τα κύτταρα θήκης εξασφαλίζοντας έτσι την ομαλή ανάπτυξη του ωοθυλακίου.[10,11,12,13]

Επικοινωνία κοκκκωδών κυττάρων – ωοκυττάρου μέσω χασμοσυνδέσμων

Τα ωοθυλάκια αποτελούνται από διαφορετικά στρώματα κυττάρων θήκη και κοκκωδών κυττάρων τα οποία περιβάλλουν το ωοκύτταρο. Με την εμφανιση του άντρου στο ωοθυλάκιο, τα κοκκώδη κύτταρα διαχωρίζονται σε δύο υπο-τυπους, που διαφέρουν ανατομικά και λειτουργικά.[14]

- Κοκκώδη κύτταρα του ωοφόρου δίσκου (cumulus granulosa cells / CC). Περιβάλλουν το ωάριο και βρίσκονται σε άμεση μεταβολική επαφή με αυτό.
- Τα τοιχωματικά ή μεμβρανικά κοκκώδη κύτταρα (mural granulose cells / MGC). Τα κύτταρα αυτά επενδύουν το τοίχωμα του ωοθυλακίου και συνεισφέρουν στο σχηματισμό του στρωματοποιημένο επιθήλιου.

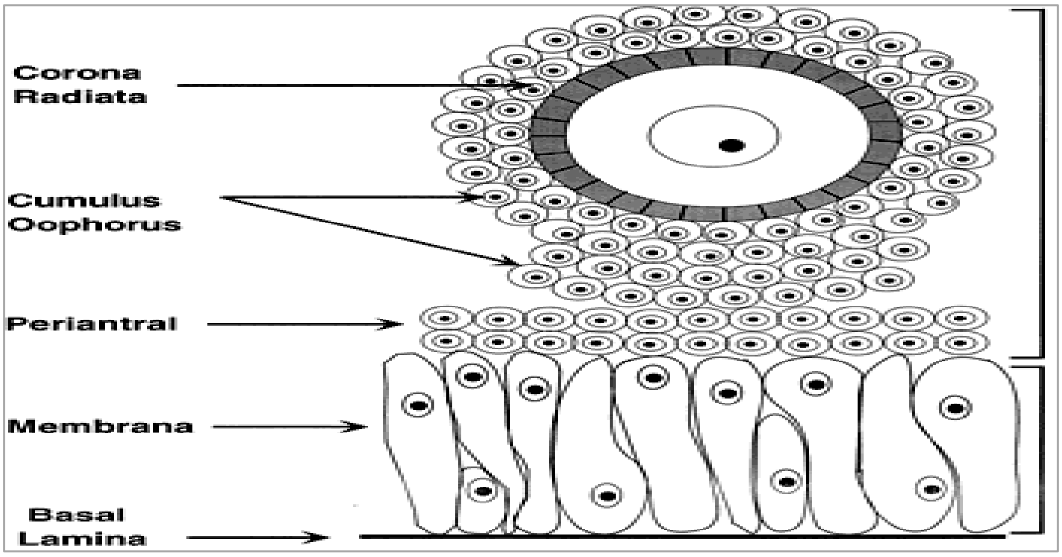
Τα υψηλά διαφοροποιημένα CC έχουν την ικανότητα και τελικά διεισδύουν στη διαφανή ζώνη, δημιουργώντας το σύμπλοκο κοκκώδη-ωάριο ή cumulus-oocyte complex (COC). Έτσι δίνεται η δυνατότητα δημιουργίας χασμοσυνδέσμων, μεταξύ κοκκωδών και ωοκυττάρου. Η επικοινωνία αυτή επιτρέπει τη μεταφορά μικρών μορίων και ιόντων από τα κοκκώδη κύτταρα προς το ωάριο αλλά και προς τα γειτονικά κοκκώδη. Μεταξύ στοιχείων που μεταφέρονται είναι ιόντα, μεταβολίτες, αμινοξέα και μικρά ρυθμιστικά μόρια τα οποία είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη του ωοκυττάρου.[15] Επαγωγικά, η επικοινωνία αυτή είναι καθοριστική για τη γονιμότητα του ατόμου.[16]



<u>**Εικόνα 7**</u>**: Σχηματική απεικόνιση εξέλιξης ωοθυλακίων όπου φαίνεται ευδιάκριτα η παρουσία κοκκωδών κυττάρων.**

1.2.1. Κοκκώδη κύτταρα και Ωοθυλακιογένεση

Το ωοκύτταρο των θηλαστικών περιβάλλεται από διάφορα στρώματα κοκκωδών κυττάρων, τα οποία καλλιεργούν το ωοκύτταρο κατά την ανάπτυξη του και συμμετέχουν ενεργά στην διαδικασία της ωορρηξίας. Στα προωθυλακιορρηκτικά ωοκύτταρα, λόγω χωρικής διακύμανσης, συναντάμε 4 διαφορετικά, κυτταρικά στρώματα: το εξώτατο στρώμα κοκκωδών κυττάρων (mural granulose cells), το πιο εσωτερικό στρώμα periantral, το ενδιάμεσο στρώμα των κυττάρων του ωοφόρου δίσκου (cumulus oophorus) και το στρώμα που βρίσκεται παραπλεύρως του ωοκυττάρου, σε άμεση επαφή με το ωοκύτταρο (corona radiata). Χαρακτηριστική ιστολογική ιδιότητα της μεμβρανικής περιοχής είναι ότι αποτελείται από ένα ψευδοσταθεροποιημένο επιθήλιο από ψηλά, κυλινδρικά κοκκώδη κύτταρα, τα οποία όλα είναι αγκυροβολημένα στο βασικό στρώμα. Η διαφοροποίηση ενός κοκκώδους κυττάρου μπορεί να ανιχνευθεί στην θέση του μέσα στην κυτταρική μάζα.



Εικόνα 8: Διάκριση κοκκωδών κυττάρων

Για παράδειγμα, τα κύτταρα στην περιοχή της μεμβράνης σταματούν να πολλαπλασιάζονται πριν από εκείνα που βρίσκονται στην κεντρική περιοχή. Η ικανότητα των κοκκωδών κυττάρων (granulosa cells – GC) στις εσωτερικές περιοχές να συνεχίσουν να διαιρούνται καθ' όλη την διάρκεια ανάπτυξης του γρααφιανού ωοθυλακίου, υποδηλώνει ότι αυτά μπορεί να είναι πρόδρομα κύτταρα. Η διακοπή της μίτωσης στην περιοχή της μεμβράνης χαρακτηρίζεται από προοδευτική έκφραση της εμφανής διαφοροποίησης στην οποία υποθέτουν τον λειτουργικό φαινότυπο των πλήρως διαφοροποιημένων κυττάρων. Αυτή η διαδικασία απαιτεί την χρονική και συντονισμένη έκφραση των γονιδίων που αποτελούν την βάση της κυτταρικής διαφοροποίησης των κοκκίων. Οι μηχανισμοί με τους οποίους συμβαίνει εμπλέκουν εξαρτώμενες από συνδετικά μονοπάτια σηματοδότησης που συνενώνονται με την ενεργοποίηση και την αναστολή συγκεκριμένων γονιδίων. Για παράδειγμα, η φυσιολογική διαφοροποίηση των μεμβρανικών κυττάρων granulosa απαιτεί την ενεργοποίηση συγκεκριμένων γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων εκείνων για την αρωματάση του κυτοχρώματος P450 (P450arom) και τον υποδοχέα LH και την αναστολή των δομικών γονιδίων στην αποπτωτική οδό. Αντίθετα, τα κύτταρα της κοκκώδους στήλης των περιοχών periantral, cumulus και corona radiata πολλαπλασιάζονται, αλλά αποτυγχάνουν να εκφράσουν τα γονίδια που εμπλέκονται σε μία τερματική διαφοροποίηση. [10,11,12,13]

2. ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ

2.1 ΟΡΙΣΜΟΣ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ

Υπογονιμότητα ορίζεται ως η αδυναμία του ζευγαριού να αποκτήσει παιδί, ύστερα από ένα έτος τακτικών σεξουαλικών επαφών χωρίς προφύλαξη ή άλλου αντισυλληπτικού μέσου.

Το 2009, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (W.H.O), ύστερα απο συνεννόηση με την Διεθνή Επιτροπή Παρακολούθησης Υποβοηθούμενων Αναπαραγωγικών Τεχνολογιών προχώρησαν στην ανάπτυξη ενός Γλωσσαρίου το οποίο περιέχει πιθανούς ορισμούς για την υπογονιμότητα και την θεραπεία αυτής. Το Γλωσσάρι περιελάμβανε έναν κλινικό ορισμό σύμφωνα με τον οποίο, “υπογονιμότητα είναι η ασθένεια του αναπαραγωγικού συστήματος η οποία χαρακτηρίζεται από την αποτυχία επίτευξης εγκυμοσύνης ύστερα από 12 μήνες συχνής, μη προστατευμένης, σεξουαλικής επαφής.’’ Είναι σημαντικό να σημειωθεί, ότι αυτός ο ορισμός που δόθηκε, αποτελεί μια κλινική περιγραφή της υπογονιμότητας και δεν προτείνει μεθόδους επίλυσης του προβλήματος.

Στο παρόν, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας βρίσκεται στην διαδικασία ενημέρωσης του Γλωσσαρίου και εξετάζει το ενδεχόμενο αναθεώρησης αυτού του ορισμού της υπογονιμότητας.[17,18]

Η υπογονιμότητα είναι ένα παγκόσμιο φαινόμενο που αφορά ένα σημαντικό ποσοστό της ανθρωπότητας και δεν παρουσιάζει καμία μείωση τα τελευταία 20 χρόνια. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας έχει υπολογίσει ότι πάνω από το 10% των γυναικών έχουν πληγεί από αυτό. Γυναίκες με σταθερή σχέση 5 ή παραπάνων χρόνων έχουν προσπαθήσει ανεπιτυχώς να αποκτήσουν παιδί ενώ όσο μειώνεται η διάρκεια της σχέσης , τόσο αυξάνεται το ποσοστό αποτυχίας. Τα αντίστοιχα ποσοστά στους άντρες παραμένουν για την ώρα άγνωστα. Τα ζευγάρια που επιθυμούν να αποκτήσουν παιδί είναι ολοένα και περισσότερα αλλά δεν είναι ικανά να τα καταφέρουν εξαιτίας των ιδιαίτερων αναγκών τους , που φαίνεται να μην διευθετούνται ειδικότερα σε πληθυσμούς χαμηλού βιοτικού επιπέδου.[18]

Παρακάτω ακολουθούν ενδεικτικά κάποια από τα βασικά αίτια υπογονιμότητας :

- Αδυναμία παραγωγής υγιών γαμετών
- Αδυναμία εμφύτευσης εμβρύου στην μήτρα
- Αδυναμία ολοκλήρωσης εγκυμοσύνης
- Σαλπιγγικός παράγοντας
- Φλεγμονές, νεοπλάσματα, ινομυώματα
- Ενδομητρίωση, πολυστικές ωοθήκες
- Ανδρικός παράγοντας
- Καρκίνος (απουσία μήτρας)
- Ανεξήγητη υπογονιμότητα
- Τρόπος ζωής

Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί, ότι ο τομέας της Αναπαραγωγικής Ιατρικής και της Ενδοκρινολογίας εξελίσσεται με γρήγορους ρυθμούς και αντιστέκεται στο φαινόμενο αυτό με περιστατικά επιτυχίας και επίλυσης προβλημάτων της υπογονιμότητας.[19]

2.2 ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ

Παρά τους πολλούς ορισμούς που έχουν δοθεί κατά καιρούς για την Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή, το CDC (Centers for Disease Control and Prevention) χρησιμοποιεί τον ορισμό που εκφράζει η πράξη του 1922 (1922 Fertility Clinic Success and Certification Act), σύμφωνα με την οποία οι Τεχνικές Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής (ART- Assisted Reproductive Technologies) περιλαμβάνουν όλες τις θεραπείες γονιμότητας στις οποίες γίνεται χειρισμός γαμετών και εμβρύων. Κατά γενικό κανόνα, οι διαδικασίες των τεχνικών αυτών περιλαμβάνουν χειρουργικά απομονωμένα ωάρια από τις ωοθήκες γυναικών, τα οποία συνενώνονται με σπέρμα στο εργαστήριο και επιστρέφουν είτε στο σώμα της γυναίκας προς γονιμοποίηση είτε δωρίζονται σε άλλη μητέρα.

Σήμερα, η πρόκληση για την ART είναι αυξημένη στο χώρο της δημόσιας υγείας και της αναπαραγωγής, λόγω των πολύδυμων κυήσεων , των πρόωρων τοκετών και των τοκετών με χαμηλού βάρους νεογνά. Το τμήμα της αναπαραγωγικής υγείας του CDC παρακολουθεί στενά την υγεία και την γονιμότητα των γυναικών , την εφηβική αναπαραγωγική υγεία και την ασφαλή μητρότητα. Ξεκίνησε μάλιστα εργασίες για να ενδυναμώσει τις υπάρχουσες προσπάθειες συλλογής δεδομένων οι οποίες ξεκίνησαν από την Αμερικανική Εταιρεία Αναπαραγωγικής Ιατρικής (ASRM- American Society For Reproductive Medicine) και την εταιρεία Τεχνολογιών Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής (SART- Society For Assisted Reproductive Technology) με σκοπό να να αναπτύξει ένα εθνικό σύστημα παρακολούθησης της χρήσης και της κατάληξης της ART.[20]

2.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

Ανάλογα με την αιτία της υπογονιμότητας προτείνονται και εφαρμόζονται οι κύριες παρακάτω μέθοδοι:

- Πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας – διέγερση ωοθηκών (ovulation induction)
- Ανάλυση και επεξεργασία σπέρματος
- Ενδομήτρια σπερματέχγυση (AIH/IUI, AID/IUI)
- Εξωσωματική γονιμοποίηση (in vitro fertilization – IVF)
- Μικρογονιμοποίηση (ICSI)
- Δωρεά εμβρύων – ωαρίων
- Προεμφυτευτική Διάγνωση (PGD)
- Παρένθετη μητρότητα

Η καινοτομία της ανθρώπινης **in vitro γονιμοποίησης** (IVF) αναπτύχθηκε από τον Roberts Edwards, ο οποίος τιμήθηκε πρόσφατα με το βραβείο Nobel.[21]

<u>Εικόνα 9</u>: Ο Βρετανός Robert Geoffrey Edwards (27 Σεπτεμβρίου 1925 – 10 Απριλίου 2013) βραβεύτηκε με το βραβείο Νόμπελ το 2010 για την ανάπτυξη της θεραπείας της ανθρώπινης γονιμοποίησης (IVF). Το έργο του ξεκίνησε την δεκαετία του 1950, με το πρώτο παιδί να γεννιέται ύστερα από εξωσωματική γονιμοποίηση το 1978 με την κλινική επίβλεψη του γυναικολόγου Patrick Christopher Steptoe(9 Ιουνίου 1913 – 21 Μαρτίου 1988).

Η **IVF** μπορεί να χρησιμοποιηθεί ενδεικτικά στις παρακάτω περιπτώσεις:

- Γυναίκες με φραγμένες η κατεστραμμένες σάλπιγγες
- Γυναίκες με πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια, διαταραχές ωορρηξίας και ινομυώματα στην μήτρα
- Άτομα με γενετικές διαταραχές
- Άνδρες με μειωμένο αριθμό σπερματοζωαρίων ή κινητικότητα σπέρματος
- Ανεξήγητη υπογονιμότητα [22]

<u>Εικόνα 10</u>: Η απεικονιζόμενη (αριστερά) Louise Brown είναι το πρώτο παιδί που γεννήθηκε με την μέθοδο της IVF στις 25 Ιουλίου 1978 στην Βρετανία, υπό την επίβλεψη των γιατρών Patrick Steptoe και Robert Edwards.

Είναι η πιο κοινή θεραπεία για ανθρώπους που δεν μπορούν να τεκνοποιήσουν με φυσιολογικό τρόπο. Σε πρώτο επίπεδο πραγματοποιείται ορμονολογικός έλεγχος και υπερηχογράφημα ωοθηκών. Χρειαζόμαστε πλήθος ωαρίων γι΄αυτό προτείνονται διάφορα πρωτόκολλα διέγερσης ωοθηκών, ανάλογα με την περίπτωση της κάθε γυναίκας. Τα ωάρια ανακτώνται μέσω μιας μικρής χειρουργικής διαδικασίας (ωοληψία) που χρησιμοποιεί απεικόνιση υπερήχων και παρέχεται φαρμακευτική αγωγή για την μείωση ή/και εξάλειψη πιθανής δυσφορίας. Παράλληλα, συλλέγεται το σπέρμα και ελέγχεται για τυχόν παθολογίες. Στο εργαστήριο στην συνέχεια, ενώνεται το σπέρμα και τα ωάρια και εφόσον πραγματοποιηθεί γονιμοποίηση μετά το πέρας 2-3 ημερών, γίνεται προσπάθεια μεταφοράς των εμβρύων στην μήτρα της μητέρας.

Η διαδικασία της IVF σε γενικότερο πλαίσιο, είναι ανώδυνη για τις περισσότερες γυναίκες. Στο σημείο αυτό, δεν πρέπει να παραληφθούν τα ενδέχομενα ρίσκα που συνοδεύονται μαζί με την μέθοδο της IVF όπως είναι οι πολύδυμες κυήσεις, χαμηλού βάρους νεογνά καθώς και τον αυξημένο κίνδυνο πρόωρου τοκετού. Τέλος, είναι μία υψηλού κόστους μέθοδος, η οποία δύναται να προκαλέσει ψυχολογική φθορά στο ζευγάρι, ειδικά στην γυναίκα.

Η **ICSI** (intracytoplasmic sperm injection) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τους ίδιους, ακριβώς, λόγους με την IVF εστιάζοντας κυρίως στην ανδρικό παράγοντα (κακή μορφολογία ή/και κακή κινητικότητα σπερματοζωαρίων, χαμηλός αριθμός σπερματοζωαρίων, παρουσία αντισπερματικών αντισωμάτων).

Η **δωρεά ωαρίων** είναι δυνατή στις περιπτώσεις όπου η γυναίκα δεν μπορεί να παράγει τα δικά της ωάρια ή είναι πολύ χαμηλής ποιότητας. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην ηλικία ή την πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια. Η **δωρεά εμβρύων** απαιτεί το σπέρμα δότη και τα ωάρια δότριας για να επιτευχθεί εγκυμοσύνη. Σε σπάνιες περιπτώσεις, ζευγάρια επιλέγουν να δώσουν κατεψυγμένα έμβρυα που δεν χρειάζονται πλέον (συνήθως ύστερα απο εξωσωματική γονιμοποίηση) σε υποψήφιους γονείς που υποβάλλονται σε IVF. [19,21,22]

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΔΙΕΓΕΡΣΗΣ ΩΟΘΗΚΩΝ

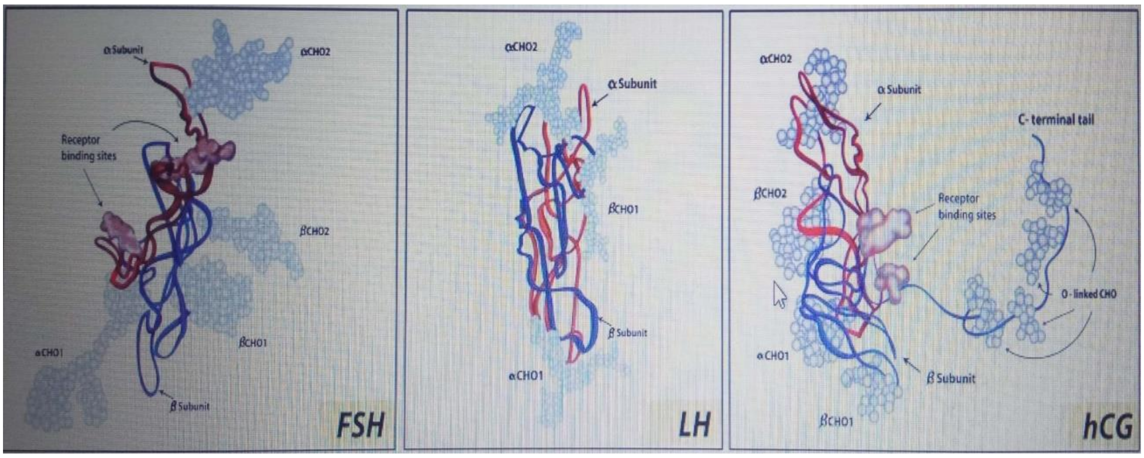
Για να εξασφαλίσουμε καλύτερα αποτελέσματα εξωσωματικής γονιμοποίησης χρειαζόμαστε μεγαλύτερο αριθμό ωαρίων και συνεπώς μεγαλύτερη διέγερση ωοθηκών. Γι΄αυτόν τον λόγο χορηγούνται φάρμακα και συγκεκριμένα πρωτόκολλα με σκοπό την αύξηση του αριθμού των ωοθυλακίων και την επίτευξη εγκυμοσύνης. Οι κύριες φαρμακευτικές ουσίες και τα πρωτόκολλα που χορήγουνται μόνα τους ή σε συνδυασμό για την διέγερση ωοθηκών είναι η κιτρική κλομιφαίνη (clomiphene citrate - CC),οι ανθρώπινες γοναδοτροπίνες (HMG), η θυλακιοτρόπος ορμόνη (FSH), η ανασυνδυασμένη FSH και τα ανάλογα του εκλυτικού παράγοντα των γοναδοτροπινών (GnRHa). Η δόση και το σχήμα των φαρμάκων ποικίλλει και εξαρτάται από την ηλικία, την αιτία της υπογονιμότητας και το ιστορικό της κάθε γυναίκας. Παρακάτω περιγράφονται συνοπτικά τα κύρια πρωτόκολλα και φαρμακευτικές ουσίες.[23]

ΚΙΤΡΙΚΗ ΚΛΟΜΙΦΑΙΝΗ (CC)

Είναι το παλαιότερο και πιο συνηθισμένο φάρμακο υπογονιμότητας για πρόκληση ωορρηξίας σε γυναίκες με ανωθυλακιορρηκτικούς κύκλους. Χορηγείται επίσης και σε ανεπάρκεια ωχρινικής φάσης καθώς και σε περιπτώσεις ανδρικής υπογονιμότητας. Είναι απλό, φθηνό και εύκολο στην χρήση. Χορηγείται εκ του στόματος, τυπικά με δόση των 50 – 150 mg για 5 ημέρες μεταξύ της δεύτερης και της πέμπτης ημέρας αυθόρμητων, φυσιολογικών ή προκληθέντων με προγεστερόνη κύκλων. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο, η αγωγή ενδείκνυται να ξεκινάει με 50 mg και η δόση σταδιακά να αυξάνεται εώς ότου επιτευχθεί η ωορρηξία. Είναι το φάρμακο πρώτης επιλογής σε γυναίκες με ολιγο/αμηνόρροια λόγω υποφυσιακής - υποθαλαμικής δυσλειτουργίας (ομάδα 2, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας) εκ των οποίων η πλειονότητα έχει πολυκυστικές ωοθήκες (PCOS). Στα πρώτα στάδια, κρίνεται απαραίτητος ο υπερηχογραφικός έλεγχος καθώς υπάρχει μεγάλος κίνδυνος πολύδυμων κυήσεων και η εμφάνιση συνδρόμου υπερδιέγερσης ωοθηκών (OHSS). Η παχυσαρκία, η υπερανδρογοναιμία και η αντίσταση στην ινσουλίνη είναι σημαντικοί παράγοντες για τους ανθεκτικούς σε κιτρική κλομιφαίνη ασθενείς. Η δράση της στοχεύει στην διαταραχή των υποδοχέων των οιστρογόνων στον υποθάλαμο και την υπόφυση, αυξάνοντας την έκλυση της GnRH και συνεπώς την έκλυση των γοναδοτροπινών της υπόφυσης , οι οποίες με την σειρά τους διεγείρουν την ανάπτυξη ωοθυλακίων στις ωοθήκες. Η θεραπεία περιλαμβάνει τουλάχιστον 6 κύκλους και δεν πρέπει να ξεπερνά τους 12 κατ΄ανώτατο όριο. Σύμφωνα με μελέτες, είναι σημαντικό να τονιστεί στο σημείο αυτό, ότι η παράταση της θεραπείας μετά από 6 κύκλους ωορρηξίας ενέχει μεγάλο ρίσκο για εμφάνιση καρκίνου των ωοθηκών , η οποία φαίνεται να είναι μεγαλύτερη μετά από τους 12 κύκλους. Για τον λόγο αυτόν συνίσταται προληπτικά περαιτέρω έλεγχος μετά το διάστημα των 6 μηνών θεραπείας με κιτρική κλομιφαίνη και λαμπαροσκοπική εξέταση ωοθηκών.[24,25,26,27]

<u>ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΠΙΝΕΣ</u>

Οι γοναδοτροπίνες είναι γλυκοπρωτεϊνικές ορμόνες, οι οποίες εκκρίνονται από κύτταρα της πρόσθιας υπόφυσης, γνωστά ως γοναδοτρόφα. Αποτελούνται απο 2 υποομάδες εκ των οποίων η α΄ υποομάδα είναι κοινή σε όλες τις γοναδοτροπίνες ενώ η β΄ ποικίλλει και είναι εκείνη η οποία προσδίδει την βιολογική δράση της καθεμίας. Η θεραπεία με γοναδοτροπίνες διαδραματίζει αναπόσπαστο ρόλο στην διέγερση ωοθηκών για θεραπείες υπογονιμότητας. Έχουν γίνει προσπάθειες τον προηγούμενο αιώνα για την βελτίωση των παρασκευασμάτων των γοναδοτροπινών, γι΄ αυτό και αναμφισβήτητα οι γοναδοτροπίνες του σήμερα έχουν καλύτερη ποιότητα καθώς και κλινική αποτελεσματικότητα από τις προηγούμενες.[28]



<u>Εικόνα 11</u>: Μόρια γοναδοτροπινών. A) Follicle - stimulating hormone (FSH) B) Luteinizing hormone (LH) C) Human chorionic gonadotropin (hCG)

Μπορούμε να τις βρούμε κυρίως στις εξής παρακάτω μορφές:

- *Ανθρώπινη Μετεμμηνοπαυσιακή Γοναδοτροπίνη (Human Menopausal Gonadotropin – hMG)*: Εξάγεται από τα ούρα μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών και έχουν δράση και ως FSH και ως LH. Τα παλαιότερα σκευάσματα περιελάμβαναν διάφορα σκευάσματα FSH , LH και hCG σε μόνο 5% καθαρές μορφές. Οι τεχνικές κάθαρσης βελτιώθηκαν, οδηγώντας σε FSH και LH με σταθεροποιημένη δραστικότητα στα 75 IU για καθε τύπο γοναδοτροπίνης, μετρούμενη με καθορισμέη in vivo δοκιμασίες (δοκιμασία steelman – pohley).
- *Ανασυνδυασμένη Θυλακιοτρόπος Ορμόνη (recombinant FSH – rFSH)*: Λόγω της αυξημένης αναγκαιότητας για πιο αξιόπιστη πηγή FSH καθώς και λόγω της πολύπλοκης δομής της ανθρώπινης γοναδοτροπίνης, όλες οι ανασυνδυασμένες γοναδοτροπίνες παράγονται πλέον χρησιμοποιώντας την κυτταρική σειρά ωαρίων του κινέζικου χάμστερ (CHO). Τα κύτταρα αυτά είναι γενετικά σταθερά και μπορούν να αλληλεπιδράσουν με ξένο dna. Επιπλέον, αναπτύσσονται σε κυτταροκαλλιέργεις εύκολα και μπορούν να παράγουν επαρκή επίπεδα ενεργών ανθρώπινων γοναδοτροπινών.
- *Ανασυνδυασμένη Ωχρινοτρόπος Ορμόνη (recombinant LH – rLH)*: Παράγεται με την τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA, περιέχοντας υψηλής βιοδραστικότητας LH. Έρευνες έχουν δείξει πως ημερήσια δόση 75 IU rLH είναι αποτελεσματική για προαγωγή βέλτιστης ανάπτυξης ωοθυλακίων και μέγιστη ανάπτυξη ενδομητρίου.
- *Ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη (human chorionic gonadotropin – hCG)*: Η χορήγηση της hCG φαίνεται να είναι η χρυσή σταθερά για την προαγωγή της ωορρηξίας ως υποκατάστατο έκλυσης της LH στο μέσον του εμμηνορυσιακού κύκλου. Λόγω των δομικών και βιολογικών ομοιοτήτων η hCG και η LH προσδένονται και ενεργοποιούν τον ίδιο υποδοχέα. Παρόλα αυτά η δράση της hCG είναι σημαντικά μεγαλύτερη από την LH λόγω του μεγαλύτερου χρόνου ημιζωής και της μεγαλύτερης συγγένειας της με τους υποδοχείς. Επί του παρόντος , τα σκευάσματα της χοριακής γοναδοτροπίνης βρίσκονται σε φιαλίδια 5.000 ή 10.000 IU για ενδομυϊκή χρήση.

- *Ανασυνδυασμένη Ανθρώπινη Χοριακή Γοναδοτροπίνη (recombinant – hCG)*: Παράγεται με την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA και λόγω της υψηλότερης καθαρότητας η r-hCG είναι περισσότερο ανεκτή απο τον ανθρώπινο οργανισμό και χορηγείται υποδόρια. Ωστόσο κλινικές μελέτες έδειξαν πως η δράση της δεν διαφέρει κλινικά απο την hCG.
- *Corifollitropin – a*: Παρήχθηκε το 2010 και έχει χρόνο ημιζωής 65 ώρες. Κλινικές μελέτες υποδεικνύουν ότι μία μόνο ένεση αυτής της ουσίας μπορεί να αντικαταστήσει τις πρώτες 7 καθημερινές ενέσεις κλασσικής γοναδοτροπίνης. Λόγω του μεγάλου κινδύνου υπερδιέγερσης ωοθηκών οι μελέτες ωστόσο, συνεχίζονται.[29,30]

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ ΜΕ GnRH ΑΝΑΛΟΓΑ (ΑΓΩΝΙΣΤΕΣ)

Έχει γίνει ευρέως γνωστό, ότι η διέγερση ωοθηκών είναι ένας σημαντικός παράγοντας που σχετίζεται άμεσα με την επιτυχία της θεραπείας της IVF και της εμβρυϊκής μεταφοράς (IVF-et). Το αγωνιστικό πρωτόκολλο της GnRH αναπτύχθηκε και εφαρμόστηκε την δεκαετία του 1980. Σχεδιάστηκε με σκοπό να καταστείλλει την απελευθέρωση της FSH και της LH από την υπόφυση με την απευαισθητοποίηση των υποφυσιακών υποδοχέων. Οι αγωνιστές που χρησιμοποιούνται στα πρωτόκολλα διέγερσης είναι η τριπτορελίνη, η λευπρολίνη και η βουσερελίνη. Η διάκριση των πρωτοκόλλων με GnRH αγωνιστές έγκειται στο χρονικό διάστημα χορήγησης τους και έτσι προκύπτουν τρία πρωτόκολλα: το βραχύ, το επιμηκυσμένο και το υπερβραχύ.[31]

Βραχύ Πρωτόκολλο (short protocol)

Αυτός ο τύπος διέγερσης εκμεταλλεύεται την αρχική αύξηση των γοναδοτροπινών στην στρατολόγηση ωοθυλακίων. Στο βραχύ πρωτόκολλο χορηγείται GnRH αγωνιστής την δεύτερη ημέρα του κύκλου. Την επόμενη ημέρα (δηλαδή τρίτη του κύκλου) ξεκινά η χορήγηση γοναδοτροπινών και ανάλογα με την ωοθηκική απάντηση η χορήγηση φαρμάκων διαρκεί 10-15 ημέρες. Στόχος θεωρείται η ανάπτυξη δύο τουλάχιστον ωοθυλακίων διαμέτρου 18 mm. Στην συνέχεια χορηγείται η hCG .

Μακρύ Πρωτόκολλο (long protocol)

Στο μακρύ πρωτόκολλο η χορήγηση 0,1 mg του αγωνιστή GnRH (πχ τριπρελλίνη) ξεκινά είτε την 2^{η} μέρα του κύκλου είτε στο μέσο της ωχρινικής φάσης του κύκλου (ημέρα 21^{η}) για να επιτευχθεί η ρύθμιση της υποφυσιακής μείωσης με την καταστολή της έκκρισης της ενδογενούς γοναδοτροπίνης. Στην συνέχεια ακολουθεί χορήγηση γοναδοτροπίνης 150 – 225 IU ημερησίως. Η προσαρμογή της δόσης της γοναδοτροπίνης βασίζεται στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων. Η συνεχής χορήγηση αγωνιστή GnRH και της γοναδοτροπίνης διαρκεί μέχρι την έναρξη της ένεσης ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης (hCG) , μέχρι δηλαδή να φτάσουν τα ωοθυλάκια το επιθυμητό μέγεθος (17- 18 mm). Η δόση της γοναδοτροπίνης ποικίλλει και εξαρτάται από διαφορετικούς παράγοντες κάθε φορά όπως είναι η ηλικία , το βάρος , η ύπαρξη πολυκυστικών ωοθηκών , το ιστορικό κάθε γυναίκας κ.λ.π. Σε κάθε περίπτωση όμως την τελική απόφαση παίρνει ο αρμόδιος ιατρός και ανάλογα προχωρά στο step-up και στο step-down πρωτόκολλο.

Στο step-up πρωτόκολλο ο ασθενής ξεκινά με μία δόση 75 IU ανθρώπινης FSH από την 3^{η} ημέρα του κύκλου για 6 ημέρες. Η δόση αυξάνεται κατά μισή αμπούλα κάθε 6 ημέρες μέχρι το ωοθυλάκιο να φτάσει τα 10 mm. Σε αυτό το σημείο συνεχίζεται η ίδια δόση μέχρι το ωοθυλάκιο να μεγαλώσει στα 18 mm. Το πρωτόκολλο αυτό φαίνεται να είναι ιδιαίτερα βοηθητικό σε περιπτώσεις όπως είναι το σύνδρομο υπερδιέγερσης ωοθηκών.

Στο step-down πρωτόκολλο, αντίθετα, συναντάμε αντίστροφη λογική. Σε διάστημα 36 κύκλων ξεκινά η χορήγηση υψηλής δόσης γοναδοτροπίνης 150 – 300 IU, η οποία μειώνεται προοδευτικά μέχρι την στιγμή της χορήγησης της hCG. Έρευνες επισημαίνουν ότι η μείωση της δόσης της γοναδοτροπίνης μπορεί να είναι μία εναλλακτική μέθοδος για την αποφυγή ανάπτυξης πολλαπλών ωοθυλακίων.

Υπερβραχύ Πρωτόκολλο (ultra – short protocol)

Αυτό το πρωτόκολλο αναπτύχθηκε και χρησιμοποιήθηκε σε περιπτώσεις όπως είναι πτωχές απαντήτριες στις οποίες έχουμε ανεπαρκή ανταπόκριση. Εδώ, ο αγωνιστής χορηγείται μόνο για 3 μέρες και στην συνέχεια χορηγούνται εξωγενώς οι γοναδοτροπίνες. Ωστόσο, η κλινική εμπειρία που έχει δημοσιευθεί , επί του παρόντος, δεν επιτρέπει την εφαρμογή τους σε τακτική, κλινική ρύθμιση.[31]

Βραχύ Πρωτόκολλο **Vs** Μακρύ Πρωτόκολλο

Η επιλογή του πρωτοκόλλου κάθε φορά βρίσκεται καθαρά και μόνο στα χέρια του ιατρού. Η απόφαση βασίζεται στα οφέλη και και τις έλλειψεις κάθε θεραπευτικής επιλογής και κυρίως στην ανταπόκριση των ασθενών. Οι ασθενείς με διέγερση με γοναδοτροπίνες διαχωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: 1) τους υψηλούς ανταποκριτές, 2) τους ενδιάμεσους ανταποκριτές και 3) τους πτωχούς ανταποκριτές. Τα κριτήρια, ωστόσο, που φαίνεται να είναι σημαντικότερα για τον προσδιορισμό της κακής ανταπόκρισης των ωοθηκών είναι τα επίπεδα FSH, ο αριθμός των ωοκυττάρων, ο ρυθμός ακυρωμένων κύκλων, η δόση γοναδοτροπίνης καθώς και τα επίπεδα E_2 . Έρευνες δείχνουν ότι το μακρύ πρωτόκολλο είναι πιο αποτελεσματικό σε γυναίκες άνω των 40 ετών, καθώς προάγει την ανάπτυξη μιας σειράς ωοθυλακίων που αναπτύσσονται ταυτόχρονα, Έτσι, ανακτώνται περισσότερα ωάρια δηλαδή περισσότερα έμβρυα και άρα καλύτερο ποσοστό εγκυμοσύνης. Παρ’όλο που διεγάγονται πολλές μελέτες για να καθοριστεί ποιο πρωτόκολλο είναι πιο αποτελεσματικό ανάλογα την περίπτωση κάθε φορά, δεν υπάρχει ξεκάθαρο αποτέλεσμα για το θέμα, δεδομένου ότι κάθε πρωτόκολλο έχει οφέλη και περιορισμούς.[32,33,34,35]

Πρωτόκολλα με GnRH ανταγωνιστή

Η εισαγωγή των ανταγωνιστών GnRH (GnRH – ant) στις υποβοηθούμενες αναπαραγωγικές τεχνολογίες (ART) για την πρόληψη της υπερβολικής αύξησηςτης LH φάνηκε να ανοίγει έναν νέο δρόμο προς μία πιο «φιλική εξωσωματική γονιμοποίηση». Σε αντίθεση με την έμμεση καταστολή της υπόφυσης που επάγεται από την GnRH-a, η χορήγηση GnRH–ant προκαλεί άμεση αναστολή απελευθέρωσης γοναδοτροπινών μέσω ανταγωνιστικής κατοχής των υποδοχέων GnRH στην υπόφυση. Ο GnRH ανταγωνιστής δρα ανταγωνίζοντας τα φυσικά μόρια GnRH στις θέσεις πρόσδεσης τους στην υπόφυση, ενώ η δράση της GnRH- a είναι να «ρυθμίσει προς τα κάτω» την ικανότητα της υπόφυσης να παράγει την αύξηση της LH. Σε σχέση με τους αγωνιστές, ο ανταγωνιστής GnRH μειώνει τις δοσολογίες FSH που απαιτούνται για την διέγερση των ωοθηκών. Μεγάλη έρευνα επισήμανε ότι γυναίκες που λαμβάνουν ανταγωνιστές έχουν σημαντικά χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης συνδρόμου υπερδιέγερσης ωοθηκών όταν υποβάλλονται σε αγωγή με GnRH – ant σε σύγκριση με γυναίκες πουέχουν υποστεί αγωγή με GnRH – a. Για την ελεγχόμενη διέγερση ωοθηκών αναπτύχθηκαν δύο αγωγές GnRH ανταγωνιστών: i) μίας χορήγησης και ii) πολλαπλών χορηγήσεων. Στο πρώτο πρωτόκολλο η χορήγηση μιας δόσης των 3 mg GnRH – ant την $7^{η}$ ημέρα διέγερσης ωοθηκών αποδείχθηκε ότι αποτρέπει μια πρόωρη αύξηση LH. Στο δεύτερο πρωτόκολλο ο GnRh – ant χορηγείται συνεχώς μέχρι την χορήγηση της hCG και η ελάχιστη αποτελεσματική δόση έχει φανεί πως είναι τα 0,25 mg. Το πρωτόκολλο της μιας δόσης έχει το πλεονέκτημα του περιορισμένου αριθμού ενέσεων, αν και χρειάζονται πρόσθετες ημερήσιες δόσεις ανταγωνιστή στο 10% των κύκλων.

Δημοσιευμένη βιβλιογραφία έδειξε ότι με την εφαρμογή GnRH – ant ανακτώνται λιγότερα ωάρια, λιγότερα έμβρυα είναι διαθέσιμα για εμβρυομεταφορά και συνεπώς χαμηλότερα ποσοστά εγκυμοσύνης. Εν κατακλείδι, ο ρόλος των ανταγωνιστών GnRH στην διέγερση των ωοθηκών για την εξωσωματική γονιμοποίηση φαίνεται να είναι ελπιδοφόρα, αν και παραμένουν πολλα ερωτήματα σχετικά με τα προτιμώμενα δοσολογικά σχήματα και τις επιδράσεις τους στα κλινικά αποτελέσματα.[36,37,38]

3. micro RNAs – miRNAs

3.1 Εισαγωγή

Η ανακάλυψη του πρώτου miRNA πραγματοποιήθηκε πριν 20 χρόνια και έφερε μεγάλη επανάσταση στον χώρο της Μοριακής Βιολογίας. Τα τελευταία χρόνια, έχουν ανακαλυφθεί πάνω από 2000 miRNAs στους ανθρώπους και δεν είναι παράλογη η άποψη ότι ρυθμίζουν συλλογικά το 1/3 των γονιδίων στο γονιδίωμα. Τα micro-RNAs συνδέονται με πολλές ανθρώπινες ασθένειες και διαφαίνεται η χρήση τους ως κλινικοί δείκτες και πιθανοί θεραπευτικοί στόχοι.

Το πρώτο miRNA ανακαλύφθηκε πριν από 30 χρόνια στο νηματοειδές Caenorhabditis elegans (C. elegans), ενός ενήλικα ερμαφρόδιτου μήκους 1 mm, το οποίο ζει σε εύκρατα εδάφη, με την ταυτοποίηση του ρυθμιστή ανάπτυξης lin – 4. Αρχικά έγινε πιστευτό το γεγονός ότι είναι ένα συμβατικό γονίδιο κωδικοποίησης πρωτεΐνης, τα εργαστήρια των Ruvkun και Ambros ανακάλυψαν ότι ο ρυθμιστής ανάπτυξης lin- 4 δεν κωδικοποιεί καμία πρωτεΐνη αλλά αντίθετα κωδικοποιείται για το ρυθμιστικό RNA 22 νουκλεοτιδίων. Απέδειξαν ότι κατά το αναπτυξιακό μονοπάτι του C.elegans, το mRNA lin-4 μπορούσε να ελέγξει την παραγωγή πρωτεΐνης lin-14, σχηματίζοντας διμερές με το υπεύθυνο για την πρωτεΐνη RNA. Η σημαντικότητα αυτή της ανακάλυψης ενισχύθηκε από την ταυτοποίηση ενός δεύτερου miRNA, του let-7. Ειδικότερα, το γονίδιο αυτό συντηρείται μεταξύ δίαφορων οργανισμών, συμπεριλαμβανομένων και των ανθρώπων, γεγονός που υποδηλώνει ότι η κατηγορία αυτή των μικρών ρυθμιστικών RNAs έχει γενικότερο και καίριο ρόλο στην Βιολογία. Θεωρείται ότι αντιπροσωπεύει το 1-5% του ανθρώπινου γονιδιώματος ενώ ρυθμίζει τουλάχιστον το 30% των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες.

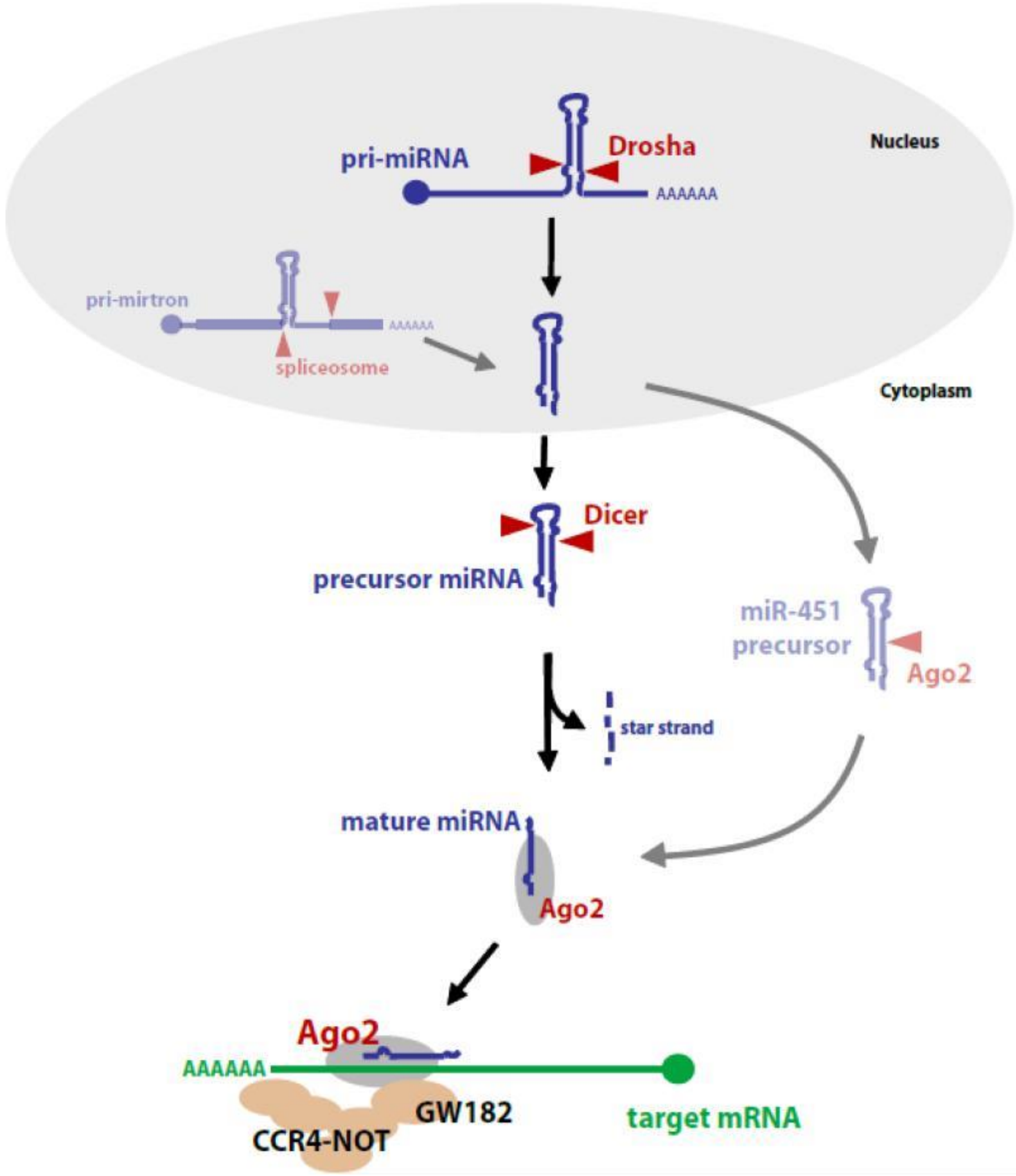
Επιπροσθέτως, τον ίδιο χρόνο, σημειώθηκε η πρόοδος στην κατανόηση των μη κωδικοποιητικών RNAs με την ανακάλυψη της οδού RNAi και συγκεκριμένα των ενεργοποιητών RNA των 21 νουκλεοτιδίων του μηχανισμού σίγασης. Στην συνέχεια, ακολούθησε η ανακάλυψη πολλών χιλιάδων miRNAs σε πολλούς οργανισμούς, με αποτέλεσμα, σήμερα, να έχουν εντοπιστεί πάνω από 2.500 miRNAs στο ανθρώπινο γονιδίωμα. [39,40]

3.1.1 Μονοπάτι Βιογένεσης miRNAs

Όλες οι οικογένειες miRNAs υποβάλλονται σε μία σειρά σταδίων βιογενέσεως, που μετατρέπουν το πρωτεύον μετάγραφο miRNA σε δραστικό, ώριμο mRNA 22 νουκλεοτιδίων. Το ώριμο miRNA φορτώνεται στο σύμπλεγμα σίγασης RNA (RISC), όπου κατευθύνει το σύμπλοκο στα στοχευμένα mRNAs, οδηγώντας σε καταστολή της μετάφρασης και αποικοδόμηση του mRNA στόχου. Αυτό το τμήμα θα καλύψει την κανονική οδό βιογένεσης miRNA που είναι υπεύθυνη για την ωρίμανση των περισσοτέρων οικογενειών miRNA. Όπως φαίνεται στην εικόνα 12, η κανονική οδός βιογένεσης miRNA παρουσιάζεται στο κεντρικό τμήμα του σχήματος. Τα miRNAs μεταγράφονται με την βοήθεια της RNA πολυμεράσης II. Το μετάγραφο pri-miRNA κόβεται από το ένζυμο Drosha και προκύπτει έτσι, το πρόδρομο miRNA. Μετά το σχίσιμο του Dicer, το ώριμο miRNA φορτώνεται στο σύμπλεγμα σίγασης τελεστών, όπου κατευθύνει την καταστολή της μετάφρασης των στόχων mRNA. [39]

<u>*Μεταγραφή*</u>

Τα miRNAs είναι μικρά, εξελικτικά συντηρημένα, μονοκλωνικά, μη κωδικοποιητικά μόρια RNA που δεσμεύουν mRNA στόχους ρυθμίζοντας την παραγωγή πρωτεΐνών με έναν από τους δύο μηχανισμούς. Τα miRNAs βρίσκονται σε όλο το γονιδίωμα. Πολλά γονίδια miRNA είναι μη κωδικοποιητικά γονίδια των οποίων το μοναδικό μεταγραφικό προϊόν είναι το miRNA. Σε άλλες περιπτώσεις το miRNA βρίσκεται εντός ενός εσωνίου ή μιας μη μεταφρασμένης περιοχής (UTR) ενός γονιδίου κωδικοποίησης πρωτεΐνης. [39]



<u>Εικόνα 12</u>: Μονοπάτι Βιοσύνθεσης miRNAs

Η μεταγραφή του γονιδίου ξενιστή miRNA από την RNA πολυμεράση ΙΙ οδηγεί στο pri-miRNA (primary miRNA) ή πρωτεύον μετάγραφο του miRNA. Το pri-miRNA συρρικνώνεται τυπικά, καλύπτεται και πολυαδενυλιώνεται με παρόμοιο τρόπο με τα mRNA που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη.

Το pri-miRNA απαιτεί δύο στάδια επεξεργασίας ενδονουκλεάσης πριν γίνει ένα ώριμο, ενεργό miRNA. Το πρώτο στάδιο επεξεργασίας λαμβάνει χώρα κατά την διάρκεια η μετά την μεταγραφή του pri-miRNA από το ένζυμο Drosha. Η πρωτεΐνη δέσμευσης RNA, DGCR8 συνδέεται με το ένζυμο αυτό και απαιτείται για το σχίσιμο του pri-miRNA. Η διάσπαση του ενζύμου απελευθερώνει τον πρόδρομο βρόγχου βλαστού από πλευρικές αλληλουχίες του pri-miRNA. Ο πρόδρομος εξάγεται εκτός του πυρήνα από την Exportin 5, με τρόπο, ο οποίος εξαρτάται από την Ran-GTPase (πυρηνική πρωτεΐνη δέσμευσης). Στο κυτταρόπλασμα λαμβάνει χώρα το δεύτερο στάδιο επεξεργασίας , καθώς η ενδονουκλεάση Dicer σχίζει την περιοχή βρόγχου του προδρόμου απελευθερώνοντας το ώριμο miRNA. Όπως και το ένζυμο Drosha, έτσι και το Dicer συνδέεται επίσης με μια πρωτείνη δέσμευσης RNA, στην προκειμένη περίπτωση την TRBP. Το προϊόν της αντίδρασης Dicer είναι ένα διπλό RNA μήκους περίπου 21 νουκλεοτιδίων. Ένας κλώνος του διπλού φορτίου φορτώνεται στο σύμπλεγμα σίγασης (RISC) ως ένα ώριμο miRNA. Ο άλλος κλώνος , που ονομάζεται κλώνος αστέρων, τυπικά υποβαθμίζεται. [39]

3.1.2 Βιολογικός ρόλος miRNAs

Η βιολογική σημασία των miRNAs στην ανάπτυξη των θηλαστικών φάνηκε για πρώτη φορά με την δημιουργία μοντέλων – ποντικών, τα οποία παρουσίαζαν έλλειψη των Dicer και DGCR8. Η απώλεια οποιουδήποτε σταδίου στη βιογένεση miRNA έχει ως αποτέλεσμα την εμβρυϊκή θνησιμότητα. Ειδικότερα, σε εξειδικευμένα knock-out Dicer και DGCR8 πειράματα ιστών, που πραγματοποιήθηκαν σε ποντίκια, παρατηρήθηκε μη ομαλή ανάπτυξη , καθιστώντας τα miRNAs καθοριστικά για τη σωστή ανάπτυξη και λειτουργία των ιστών. Φυσικά, η εξουδετέρωση αυτών των γονιδίων οδηγεί σε απώλεια όλων των miRNAs (εκτός από τα σπάνια μη-κανονικά miRNA). Επομένως είναι δύσκολο να ανατεθούν ρόλοι για συγκεκριμένα miRNAs στην ανάπτυξη αυτών των ιστών.

Οι μελέτες υπεργονικής εκδήλωσης είναι άλλη μία προσέγγιση για την αναγνώριση των βιολογικών ρόλων των μεμονωμένων miRNAs. Αυτές οι μελέτες έχουν το μειονέκτημα των αντικειμένων υπερέκφρασης που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε εσφαλμένη ερμηνεία των δεδομένων. Ωστόσο, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να αποκαλύψουν βιολογικούς ρόλους που δεν έχουν ανιχνευθεί σε μελέτες νοκ-άουτ εξαιτίας του πλεονασμού της οικογένειας miRNA. Οι προαναφερθείσες προσεγγίσεις, μαζί με την αναγνώριση του δικτύου στόχων miRNA, αποκάλυψαν ρόλους για την οδό miRNA στην ανάπτυξη ή/και την λειτουργία των περισσότερων ιστών στο σώμα. Τα miRNAs έχουν συνδεθεί με πολυάριθμες πλευρές της νευρωνικής λειτουργίας, συμπεριλαμβανομένης της αναπτυξιακής αναδιαμόρφωσης, του σχηματισμού μνήμης καθώς και της ανάπτυξης της σπονδυλικής στήλης. Τα miRNAs έχουν συνδεθεί με την λειτουργία πολλών αιμοποιητικών γραμμών, συμπεριλαμβανομένων των ουδετερόφιλων, των λεμφοκυττάρων, των ερυθροκυττάρων, των μεγακαρυοκύτταρων και των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων. Αυτά τα παραδείγματα είναι ένα περιορισμένο υποσύνολο των περιγραφόμενων λειτουργιών των miRNAs στην φυσιολογική, ανθρώπινη βιολογία.[39]

3.1.3 Καρκίνος και miRNAs

Μεταβολές στην έκφραση miRNA έχουν τώρα καταδειχθεί σε πολλούς τύπους καρκίνου. Παλαιότερες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν, χρησιμοποίησαν πλατφόρμες υβριδισμού με μικροσυστοιχίες, RT-PCR και πλαστικοποίηση με βάση τα σφαιρίδια, ενώ πιο πρόσφατες μελέτες χρησιμοποίησαν το προφίλ NGS. Τα miRNAs έχουν ταυτοποιηθεί ότι είναι αυξημένα στον καρκίνο, για παράδειγμα το miR-21 και το σύμπλεγμα miR-17-92, ενώ άλλες οικογένειες miRNA συχνά ρυθμίζονται προς τα κάτω στον καρκίνο, συμπεριλαμβανομένων των οικογενειών ***let-7*** και miR-34. Τα ειδικά miRNA του ιστού συχνα μειώνονται στον καρκίνο όπως για παράδειγμα το miR-122 στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Αυτό υποστηρίζει την υπόθεση ότι πολλές οικογένειες miRNA ενισχύουν την κατάσταση κυτταρικής διαφοροποίησης και οι μειώσεις αυτών των miRNAs μπορούν να επιτρέψουν παθολογική μείωση της διαφοροποίησης ή της κυτταρικής κατάστασης.

Λειτουργικές μελέτες έχουν υποστηρίξει τον ρόλο κάποιων miRNAs για την προώθηση ή την πρόληψη της ανάπτυξης και της εξέλιξης του καρκίνου. Ένα καλό παράδειγμα είναι το σύμπλεγμα miR-17-92. Αυτή η ομάδα έξι miRNAs είναι αυξημένη σε πολλούς τύπους καρκίνου, κυρίως σε πολλά λεμφώματα και λευχαιμίες. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι αυτή η ομάδα miRNA μπορεί να προάγει τον καρκίνο όταν εκφράζεται εκτοπικά, συχνά σε συνεργασία με το ογκογονίδιο c-Myc. Το miR-34 είναι άλλη μία αξιοσημείωτη οικογένεια miRNA που σχετίζεται με τον καρκίνο. Αποτελούμενο από τρία μέλη της οικογένειας, αυτά τα miRNAs δίδονται απευθείας από το p53 και λειτουργούν παράλληλα με τις πρωτεΐνες της οικογένειας p21 και Bcl2 για την προώθηση της διακοπής και της απόπτωσης του κυτταρικού κύκλου.

Πολλές άλλες οικογένειες miRNA μεταβάλλονται σε καρκίνους και οι μελέτες μεγάλης κλίμακας για την ανάλυση προφίλ έχουν αποκαλύψει υπογραφές για τύπους και υπότυπους καρκίνου.[41,46]

Τα miRNAs ως Θεραπευτικοί στόχοι

Καθώς τα miRNAs συνδέονται αιτιωδώς με αυξανόμενο αριθμό ανθρώπινων ασθενειών, πραγματοποιούνται προσπάθειες για την ανάπτυξη θεραπευτικών μεθόδων που στοχεύουν άμεσα το miRNA. Ανάλογα με το miRNA και τον υποκείμενο θεραπευτικό στόχο έχουμε μιμητικά miRNAs και αναστολείς miRNAs. Ο πιο υποσχόμενος υποψήφιος είναι το φάρμακο Regulus RG-101, που βρίσκεται σε κλινικές δοκιμές φάσης ΙΙ. Αυτό το φάρμακο είναι ένας ακτινοηματικός αναστολέας του miR-122 που αναπτύσσεται ως θεραπευτικό HCV. Ένας μεγάλος αριθμός υποσχόμενων θεραπευτικών στόχων miRNA βρίσκεται σε εξέλιξη από τον επιστημονικό κόσμο και τις βιομηχανίες, συμπεριλαμβανόμενων των στόχων που αφορούν τις καρδιαγγειακές παθήσεις και τον καρκίνο.[41]

3.2 miRNAs και Υπογονιμότητα

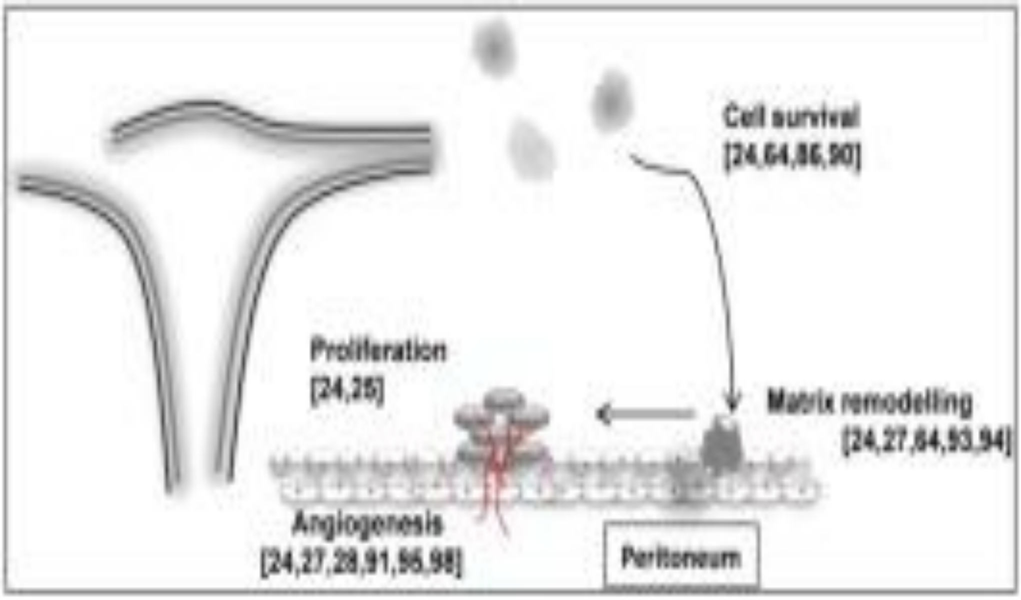
Από την πρώτη απόδειξη της εμπλοκής των miRNAs σε διάφορες αναπαραγωγικές διεργασίες μέσω του νοκ-άουτ του Dicer, διεξήχθησαν αρκετές μελέτες για να διερευνηθεί το πρότυπο έκφρασης και ο ρόλος των miRNAs στην ωοθυλακική ανάπτυξη, στην ανάπτυξη εμβρύων, στην εμβρυϊκή μητρική επικοινωνία, στην διαπίστωση της εγκυμοσύνης και σε διάφορες αναπαραγωγικές ασθένειες. Παρόλο που οι εξελίξεις στην τεχνολογία αλληλούχισης τροφοδότησαν μελέτες miRNA σε είδη θηλαστικών, η παρουσία εξωκυτταρικών miRNA σε διάφορα βιολογικά υγρά, συμπεριλαμβανομένων των ωοθυλακίων, του πλάσματος του αίματος, των ούρων, έστρεψε το επιστημονικό ενδιαφέρον στην χρήση των miRNAs ως διαγνωστικοί δείκτες. Μελέτες δείχνουν πως υπάρχει μεγάλη συνάφεια miRNAs και γυναικείων αναπαραγωγικών διαταραχών όπως είναι το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, ενδομητρίωσης καθώς και περιπτώσεις μη φυσιολογικών κυήσεων. Τέλος να τονιστεί πως συζητούνται εκτενώς ο μηχανισμός απελευθέρωσης και ο ρόλος των εξωκυτταρικών miRNAs στην επικονωνία μεταξύ των κυττάρων καθώς και ο δυνητικός τους ρόλος ως μη επεμβατικοί δείκτες στην γυναικεία γονιμότητα.[42]

3.2.1 miRNAs και Ενδομητρίωση

Διάφορες επιστημονικές ομάδες έχουν μελετήσει τον πιθανό ρόλο των miRNA στην ανάπτυξη ενδομητρίωσης επί σειρά ετών. Τα miRNAs αυξάνουν ως ισχυροί ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης στα πιο σημαντικά συστήματα που εμπλέκονται στην παθογένεση της ενδομητρίωσης.

Η ενδομητρίωση είναι μια καλοήθης, εξαρτώμενη από τα οιστρογόνα, φλεγμονώδης διαταραχή, η οποία χαρακτηρίζεται από την παρουσία ιστού που μοιάζει με ενδομήτριο, έξω από την μήτρα. Η βλάβη της ενδομητρίωσης εντοπίζεται στο περιτόναιο (περιτοναϊκές αλλοιώσεις) , στις ωοθήκες είτε ως επιφανειακά εμφυτεύματα είτε ως ενδομητριωτικές κύστεις και ως βαθιά διηθητικές βλάβες που μπορούν να επεκταθούν στο έντερο, την ουροδόχο κύστη και τον ουρητήρα.

Οι πυελικές συμφύσεις σχετίζονται με τις προαναφερθείσες αλλοιώσεις, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τα κύρια συμπτώματα της ενδομητρίωσης, του πυελικού πόνου και της στειρότητας.



Εικόνα 12: Όπως φαίνεται στο σχήμα, η κυτταρική επιβίωση, η αναδιαμόρφωση της μήτρας, ο πολλαπλασιασμός και η αγγειογένεση είναι βασικά συστήματα στην παθοφυσιολογία αυτής της νόσου και ρυθμίζονται δυνητικά από τα miRNAs.

Στο πεδίο των miRNAs έχουν αναφερθεί διαφορές στην έκφραση του miRNA μεταξύ των ενδομητρικών βλαβών και του ευτοπικού ενδομητρίου από γυναίκες με ενδομητρίωση αλλά λίγες μελέτες επικεντρώθηκαν στις διαφορές μεταξύ του ευτοπικού ενδομητρίου με ή χωρίς ενδομητρίωση. Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε με σκοπό να μελετηθεί το προφίλ έκφρασης του miRNA στο ενδομήτριο σε γυναίκες με ή χωρίς ενδομητρίωση, αναφέρθηκε μία ρύθμιση κάτω από 4 miRNAs (miR-34c-5p, miR-9, miR-9 *, miR-34b *) από το ευτοπικό ενδομήτριο με ενδομητρίωση σε σύγκριση με το ενδομήτριο μάρτυρα. Σύμφωνα με του ρυθμιστικούς μηχανισμούς του miRNA, τα χαμηλά ρυθμισμένα επίπεδα ενός miRNA συνεπάγονται την προς τα πάνω ρύθμιση της μετάφρασης του mRNA στόχου. Σε μία δεύτερη μελέτη που πραγματοποιήθηκε, εξετάστηκε η έκφραση 667 ανθρώπινων miRNAs μέσω συστοιχιών PCR σε 25 γυναίκες χωρίς ενδομητρίωση και 21 με ενδομητρίωση των ωοθηκών. Η επικύρωση των αποτελεσμάτων οδήγησε ότι το miR-483-5p (ρυθμιστής του IGF2) και το miR-629-3p που εμπλέκονται στην φλεγμονή, ρυθμίστηκαν προς τα κάτω στο ευτοπικό ενδομήτριο των ασθενών σε σύγκριση με τους μάρτυρες. [43]

3.2.2. miRNAs και Σύνδρομο Πολυκυστικών Ωοθηκών (PCOS)

Το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS) είναι μία περίπλοκη, πολυπαραγοντική, ενδοκρινική διαταραχή που επηρεάζει περίπου το 5-10% όλων των γυναικών αναπαραγωγικής ηλικίας. Το σύνδρομο αυτό μπορεί να οριστεί βάση τριών διαφορετικών κριτηρίων. Ανάλογα με τα κριτήρια αυτά που χρησιμοποιούνται καθώς και τον πληθυσμό που μελετήθηκε, ο επιπολασμός των PCOS στις γυναίκες σε αναπαραγωγική ηλικία διαφέρει από 6% έως 8%, χρησιμοποιώντας τα κριτήρια του Εθνικού Ινστιτούτου Υγείας και μέχρι 20% χρησιμοποιώντας τα κριτήρια του Ρότερνταμ. Όλα τα κριτήρια περιλαμβάνουν σε κάποιο βαθμό, μορφολογία πολυκυστικών ωοθηκών σε υπέρηχο, υπερανδρογοναιμία (κλινική ή/και βιοχημική), ανωθυλακιορρηξία. Η αιτιολογία του PCOS είναι ακόμα ασαφής αλλά οι περιβαλλοντικοί και γενετικοί παράγοντες μπορούν να συμβάλλουν στην παθογένεση του συνδρόμου πολυστικών ωοθηκών.

Οι ρόλοι των miRNAs κατά την ανάπτυξη των ωοθυλακίων, την στερεειδογένεση και το PCOS δεν έχουν διασαφηνιστεί ακόμα απόλυτα παρά τις μεγάλες προσπάθειες που έχουν πραγματοποιηθεί από τους επιστήμονες. Παρουσιάζοντας μεγάλη αφθονία στον ορό, τα miRNAs θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως ένας μη επεμβατικός βιοδείκτης για το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών καθώς έχει αποδειχθεί πως είναι σταθερά στον ορό, ανθεκτικά στην δράση της νουκλεάσης και είναι εύκολο να ανιχνευθούν. Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε 12 ασθενείς με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών , 12 υγιείς γυναίκες και σε 12 αρσενικούς μάρτυρες αποκάλυψε ότι η παχυσαρκία , η οποία φαίνεται να συνδέεται άμεσα με PCOS, μείωσε σημαντικά την έκφραση 4 miRNAs που επιλέχθησαν να αξιολογηθούν στο ολικό αίμα: miR-21, miR-27b, miR-103 και miR-155 και σε γυναίκες και σε άντρες αλλά τείνουν να δείχνουν αύξηση σε γυναίκες με PCOS. Περαιτέρω ανάλυση των ορμονών έδειξε συσχέτιση μεταξύ επιπέδων τεστοστερόνης και miR-21, miR-155 και miR-27b. Ενδεχομένως, η αυξημένη ελεύθερη τεστοστερόνη που υπάρχει στα δείγματα των γυναικών με PCOS θα μπορούσε να εξηγήσει την αύξησης έκφρασης αυτών των miRNAs.[44]

3.2.3. miRNAs και Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή

Τα microRNAs (miRNAs) πρόσφατα εμφανίστηκαν ως σημαντικοί ρυθμιστές της σταθερότητας της γονιδιακής έκφρασης. Στο ενδομήτριο, τα miRNAs εμπλέκονται στις δυναμικές αλλαγές που συνδέονται με τον εμμηνορρυσιακό κύκλο, στην εμφύτευση και τις αναπαραγωγικές διαταραχές. Σε μια ανασκόπηση , που πραγματοποιήθηκε, με σκοπό να αξιολογηθούν οι πιθανές βιολογικές οδοί που συνδέουν αλλαγμένα προφίλ miRNAs με αποτυχία in vitro εξωσωματικής γονιμοποίησης (IVF) , έγινε φανερό το γεγονός πως τα miRNAs διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στην αναπαραγωγή και συγκεκριμένα στην κατανόηση μοριακών δραστηριοτήτων όπως είναι η εμφύτευση και η περαιτέρω εξέλιξη του εμβρύου. Πρόκληση αποτελεί η αποτελεσματικότητα οποιασδήποτε παρέμβασης που καθορίζει εάν το προφίλ miRNA θα μπορούσε να υιοθετηθεί σε βάση ρουτίνας για να βελτιωθεί τόσο η διαγνωστική ακρίβεια, όσο και η κατευθυνόμενη θεραπεία της εξωσωματικής γονιμοποίησης σε επόμενες γενιές. Αναλύσεις των miRNAs σε ανθρώπινους, θηλυκούς, αναπαραγωγικούς ιστούς έδειξαν ότι τόσο η μήτρα (ενδομήτριο, μυομήτριο και τράχηλος), όσο και οι ωοθήκες είναι πλούσια εμπλουτισμένες σε μεμονωμένα miRNAs. Επιπλέον, δεν είναι λίγες οι αναφορές της συμμετοχής των miRNAs στην αλλοιωμένη δεκτικότητα του ενδομητρίου, στην ενδομητρίωση, στις μη φυσιολογικές εγκυμοσύνες, στις γυναικείες κακοήθειες καθώς και τις διαταραχές της γονιμότητας. Επιπροσθέτως, στις ωοθήκες τα γεγονότα που εμφανίζονται σε κυκλικό πρότυπο, όπως η στρατολόγηση αυξανόμενων ωοθυλακίων, η ατρησία, η ωορρηξία και ο σχηματισμός ωχρινικών ιστών, πιστεύεται ότι ρυθμίζονται από γονίδια ελεγχόμενα από miRNAs.Σε υπογόνιμο πλυθυσμό, υπάρχει μια σημαντική διαφορά στα προφίλ miRNA σε σύγκριση με τον γόνιμο πληθυσμό. Σύμφωνα με τους ερευνητές, παρατηρείται μείωση στην έκφραση 6 miRNAs σε σύγκριση με βλαστοκύστες ελέγχου γόνιμου δότη που προέρχονται από ασθενείς με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών ή υπογονιμότητα αρσενικού παράγοντα, ενώ ήταν μορφολογικά παρόμοιες.

Εν κατακλείδι, τα miRNAs εμπλέκονται σε πολυάριθμες διεργασίες που επηρεάζουν τη λειτουργία του ανθρώπινου αναπαραγωγικού συστήματος και επιπλέον τη σύλληψη, την διαδικασία εμφύτευσης και την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Τα δημοσιευμένα δεδομένα και οι συνεχιζόμενες δοκιμές είναι περιορισμένες, πιθανόν γιατι το κόστος θα μπορούσε να δημιουργήσει μια σειρά εμποδίων κατά την εκπόνηση μελετών μεγάλης κλίμακας με σκοπό την καθιέρωση ισχυρών συμπερασμάτων σχετικά με την εφαρμογή των miRNAs στην ρουτίνα της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Παρά το γεγονός αυτό, οι προσδοκίες παραμένουν μεγάλες και οι προσπάθειες συνεχίζονται στον ερευνητικό κόσμο καθώς τα miRNAs αποτελούν μεγάλη πρόκληση για την επιστήμη.[45]

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΟΝΙΔΙΟΥ

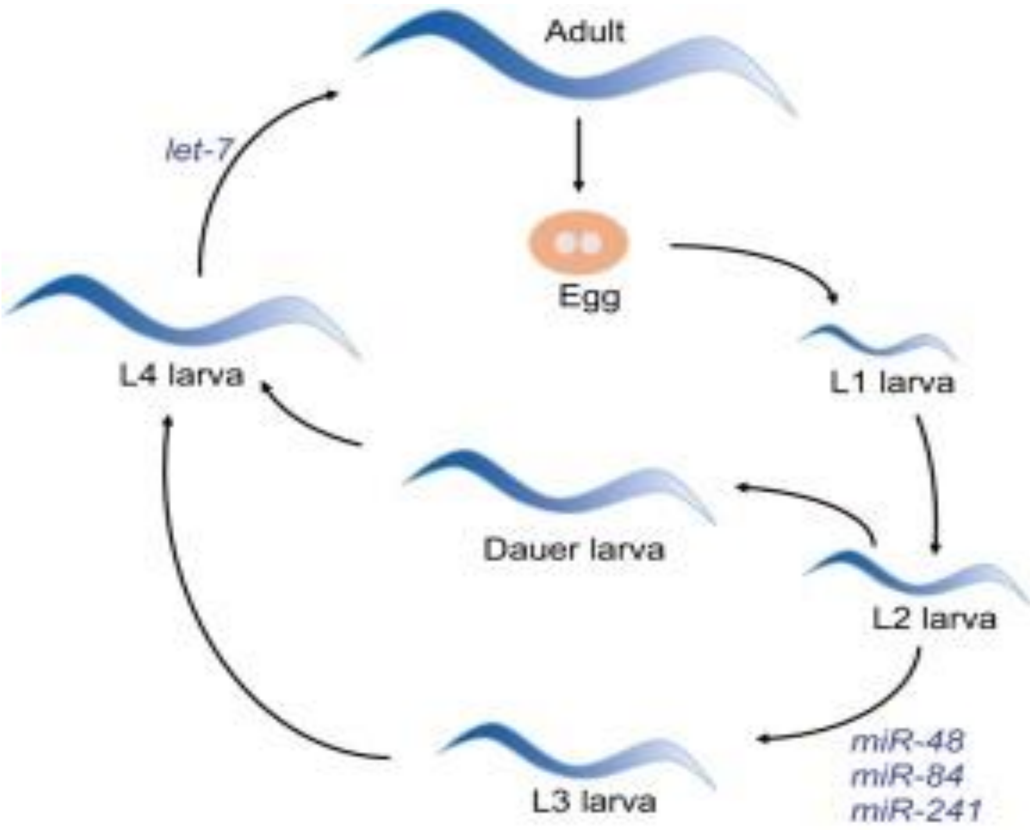
4.1 Εισαγωγή

Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη ενότητα, τα miRNAs είναι μία ομάδα μικρών, μη κωδικοποιημένων RNAs, ικανών να ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση. Τα miRNAs lin-4 και let-7 ήταν τα πρώτα που ανακαλύφθηκαν και αποδείχθηκε ότι ενεργοποιούν έναν χείμαρρο γονιδιακής έκφρασης , υπεύθυνο για την ρύθμισης της ανάπτυξης γεγονότων μέσω μεταγραφικής σίγησης γονιδίων στον Caenorhabditis elegans. Το miRNA που μελετά η παρούσα διπλωματική και θα αναλυθεί περαιτέρω είναι το let-7c, το οποίο ανήκει στην οικογένεια let-7. Το γονίδιο let-7 ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά στο Caenorhabditis elegans (C.elegans) , ενός μη παθογόνου μικροοργανισμού, μέλος της οικογένειας Nematoda και μήκους 1 mm, το οποίο ζει στο έδαφος. Παρόλο που για καιρό ήταν πιστευτό το γεγονός ότι το γονίδιο αυτό διαδραματίζει σημαντικό ρόλο μόνο στον σκώληκα, η σπουδαιότητα του έγινε φανερή το 2001, όταν κλωνοποιήθηκαν και αναγνωρίστηκαν μόρια miRNA από πολλούς οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου.[47,48]

Οικογένεια let-7

Η οικογένεια let-7 αποτελείται από 9 ώριμα let-7 miRNAs , που κωδικοποιούνται από 12 διαφορετικούς γονιδιωματικούς τόπους, μερικούς από τους οποίους συσσωρεύονται. Τα miRNAs αυτά βρίσκονται στο επίκεντρο της σύγχρονης μελέτης και έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών σε διάφορους τομείς, όπως η ανάπτυξη, η βιολογία των βλαστικών κυττάρων, η γήρανση και ο μεταβολισμός. Επιπλέον, υπάρχει ένα μεγάλο σύνολο στοιχείων που συνδέουν την απώλεια της έκφρασης let-7 και την ανάπτυξη επιθετικών καρκίνων. Εκτός από την οδό κανονικής βιογένεσης, το let7 έχει βρεθεί ότι ρυθμίζεται από πρωτεϊνικούς παράγοντες, όπως για παράδειγμα οι πρωτεΐνες δέσμευσης RNA που έχουν προηγουμένως αναγνωριστεί ως ρυθμιστές πρωτεϊνικών κωδικών mRNAs. Πρόσφατα η άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ miRNAs αναγνωρίστηκε ως μία νέα οδός για τον έλεγχο της έκφρασης let-7.

Δεδομένου ότι η έκφραση των let-7 σταδιακά αυξάνεται κατά την διάρκεια της ανάπτυξης και αυτό το miRNA διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές βιολογικές διαδικασίες , θα μπορούσε να αναμένεται ότι η βιογένεση του let-7 θα πρέπει να ρυθμιστεί αυστηρά. Πράγματι, μελέτες έχουν δείξει ότι το LIN28A/B μπλοκάρει την βιογένεση του let-7 με αρκετούς, διαφορετικούς τρόπους για να διατηρήσει την αυτοδυναμία στα βλαστοκύτταρα.[49]

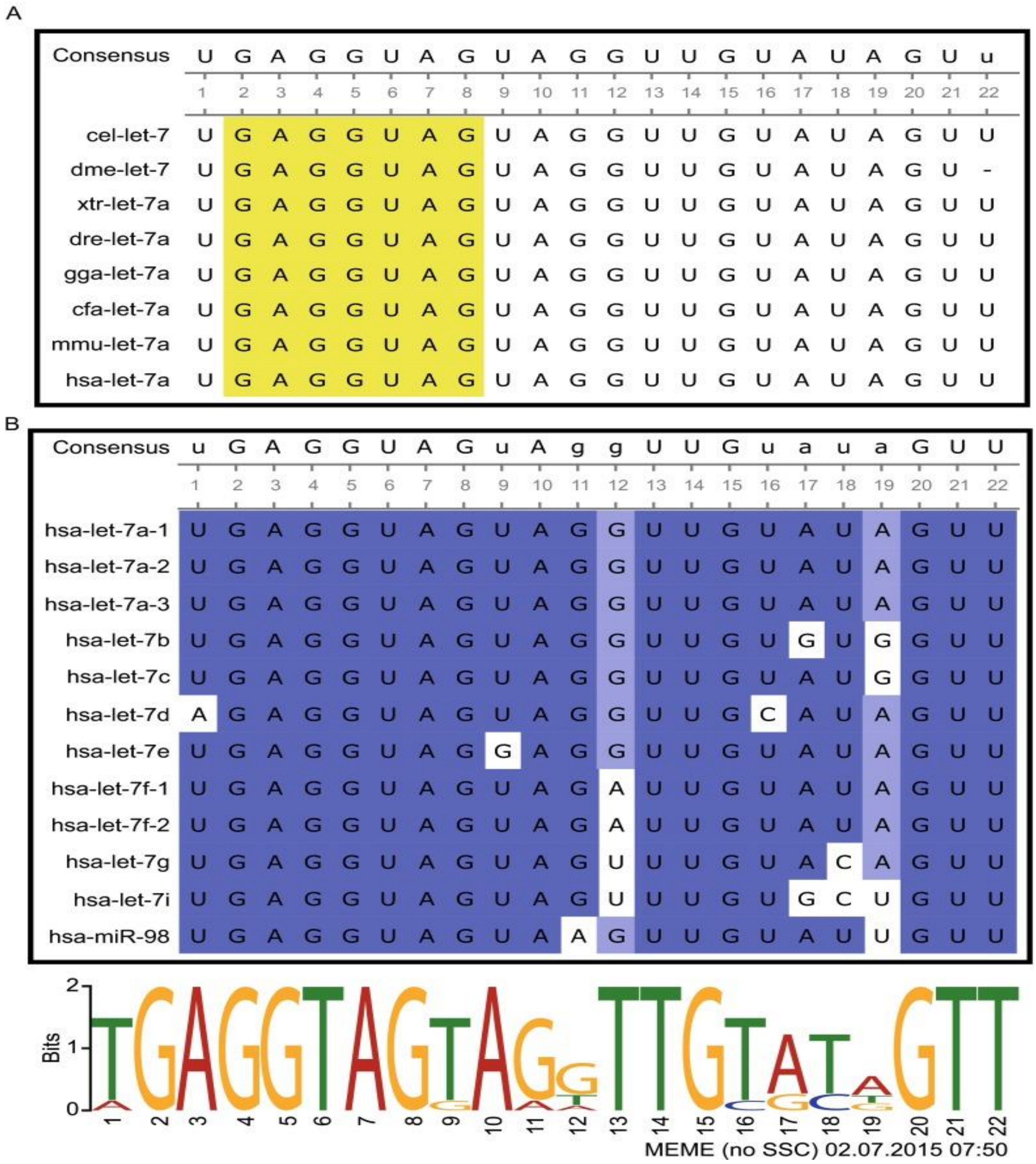


<u>Εικόνα 13</u>: Κύκλος ζωής του C.elegans, τα αυγά που τοποθετούνται από τον ενήλικα C.elegans περνούν από 4 αναπτυξιακά στάδια : προνύμφες L1, L2, L3 και L4. Κατά την διάρκεια του κύκλου ζωής του C. elegans , το miR-48 , miR-84 και miR-241 ρυθμίζουν την μετάβαση από L2 σε L3, ενώ το let-7 ρυθμίζει την μετάβαση L4 σε ενήλικα.

Η οικογένεια let-7 ανευρίσκεται σε διάφορα είδη ζώων αλλά και στους ανθρώπους. Χρησιμοποιώντας υπολογιστικές αναλύσεις, όπως το BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), οι ερευνητές ανακάλυψαν συνολικά 28.645 miRNAs από 223 είδη που έχουν καταγραφεί στην έκδοση miRBase 21.0. Αυτό το σημαντικό σύνολο περιλαμβάνει 401 αλληλουχίες let-7 από διάφορους οργανισμούς. Σύμφωνα με την miRBase, είδη όπως το Caenorhabditis elegans(νηματώδης), το Drosophila melanogaster (μύγα), το Xenopus tropicalis (βάτραχος), το Danio rerio (ψάρι), το

Gallus gallus (κοτόπουλο), Canis familiaris (σκύλος), Mus musculus (ποντίκι) και ο Homo sapiens (άνθρωπος) εκφράζουν όλα μια εκδοχή της οικογένειας let-7, που κατέχει την ακριβή ακολουθία του «UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU». Οι περισσότερες από τις αλληλουχίες let-7 περιλαμβάνουν την «αλληλουχία σπόρων». Αυτή η εξαιρετικά συντηρημένη αλληλουχία που καλύπτει 2 εώς 8 νουκλεοτίδια σε μερικά miRNAs και είναι ένα βασικό συστατικό που απαιτείται για την αναγνώριση στόχου από το σύμπλεγμα σίγασης από το RNA (RISC). Το χαρακτηριστικό αυτό των miRNAs let-7 υποδηλώνει ότι οι στόχοι και οι λειτουργίες αυτών μπορεί να είναι παρόμοιες σε διάφορα ζωϊκά είδη.[49]

Αν και η ακολουθία let-7 είναι καλά συντηρημένη από το C.elegans στον άνθρωπο, πολλές διαφορές διαχωρίζουν τα στενά συγγενικά μέλη της οικογένειας let-7 των διάφορων ζωϊκών ειδών. Ενώ το νηματώδες και η μύγα έχουν ένα μόνο let-7 miRNA, τα άλλα ζώα όπως τα ψάρια και τα θηλαστικά έχουν μεγαλύτερη ποικιλία των μελών της οικογένειας let-7, συμπεριλαμβανομένων των let-7a, -7b, -7c, -7d, -7e και miR-98. Κάθε μέλος της οικογένειας let-7 είναι συχνά παρών σε πολλαπλά αντίγραφα σε όλα τα γονιδιώματα υψηλότερων ζώων. Για να γίνει διάκριση μεταξύ των ισομορφών, τοποθετείται ένα γράμμα ή/και ένας αριθμός μετά τον όρο «let-7». Οι διαφορές αλληλουχίας υποδεικνύονται με γράμματα π.χ. let-7a και -7b, ενώ διαφορετικοί γονιδιωματικοί τόποι που εκφράζουν την ίδια αλληλουχία, υποδεικνύονται με αριθμούς. Ως παράδειγμα του τελευταίου, οι πρόδρομοι ανθρώπινων let-7a-1, let-7a-2 και let-7a-3 κωδικοποιούνται σε χρωμοσώματα 9, 11 και 12 αντίστοιχα αλλά όλα παράγουν το ίδιο miRNA let-7a. Έτσι, οι αριθμοί πρόδρομων αλληλουχιών που κωδικοποιούνται στο γονιδίωμα ενός είδους μπορεί να διαφέρουν από τον αριθμό των ώριμων miRNAs που εκφράζονται σε αυτό το είδος. Στον άνθρωπο, για παράδειγμα 12 ξεχωριστοί τόποι κωδικοποιούν 9 ώριμα let-7 miRNAs. Στον Πίνακα 1 που ακολουθεί, βλέπουμε όλα τα let-7 miRNAs που χαρακτηρίζουν το κάθε είδος.



<u>Εικόνα 13</u>: **Σύγκριση αλληλουχίας των μελών της οικογένειας let-7 σε δίαφορα είδη ζώων: (A) C. elegans (cel), D. melanogaster (dme), X. tropicalis (xtr), D. rerio (dre), G. gallus (gga), C. familiaris (cfa), M. musculus (mmu) και H. sapiens (hsa), τα οποία όλα διαθέτουν την ώριμη αλληλουχία let-7 (let-7a) του 'UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU'. (B) Ευθυγράμμιση ακολουθίας ώριμων μορφών των μελών της οικογένειας let-7. Οι ώριμες ακολουθίες συναίνεσης τοποθετούνται στην κορυφή του κουτιού, όπου κεφαλαιοποιούνται μόνο τέλεια ευθυγραμμισμένες ακολουθίες. Συναφείς ακολουθίες των ώριμων μελών της οικογένειας let-7, όπως εκτιμήθηκε από το MEME.**

Mature let-7	*C. elegans*	*D. melanogaster*	*D. rerio*	*M. musculus*	*H. sapiens*
	Nematode	**Fly**	**Zebrafish**	**Mouse**	**Human**
let-7a	*let-7*	*let-7*	*let-7a-1, 2, 3, 4,5, 6*	*let-7a-1, 2*	*let-7a-1, 2, 3*
let-7b			*let-7b*	*let-7b*	*let-7b*
let-7c			*let-7c-1, 2*	*let-7c-1, 2*	*let-7c*
let-7d			*let-7d-1, 2*	*let-7d*	*let-7d*
let-7e			*let-7e*	*let-7e*	*let-7e*
let-7f			*let-7f*	*let-7f-1, 2*	*let-7f-1, 2*
let-7g			*let-7g-1, 2*	*let-7g*	*let-7g*
let-7h			*let-7h*		
let-7i			*let-7i*	*let-7i*	*let-7i*
let-7j			*let-7j*		
let-7k					
miR-98				*miR-98*	*miR-98*

Πίνακας 1: Χαρακτηρισμός οικογένειας let-7 σε διαφορετικά είδη

4.2 Βιολογικός ρόλος της οικογένειας let-7

Ο υψηλός βαθμός συντήρησης μεταξύ των miRNAs των 7 διαφορετικών ζωϊκών ειδών υποδηλώνει ότι μπορούν να διαδραματίσουν σημαντικούς (και δυνητικά παρόμοιους) ρόλους στις βιολογικές διεργασίες διαφόρων οργανισμών. Πράγματι, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι τα μέλη της οικογένειας let-7, γενικά, προωθούν την διαφοροποίηση κατά την διάρκεια της ανάπτυξης και λειοτουργούν ως καταστολείς όγκων σε διάφορους καρκίνους (π.χ καρκίνος του μαστού). Αξίζει να αναφερθεί πως στο C. elegans, το γονίδιο let-7 ελέγχει τον κρίσιμο αναπτυξιακό χρονισμό της τελευταίας μετάβασης των προνυμφών (L4 προς ενηλίκων) μέσω της ρύθμισης των παραγόντων μεταγραφής σε διαφορετικούς ιστούς. Όσον αφορά τα θηλαστικά, η έκφραση του let-7 είναι υψηλή κατά την διάρκεια της εμβρυογένεσης και της ανάπτυξης του εγκεφάλου.[50]

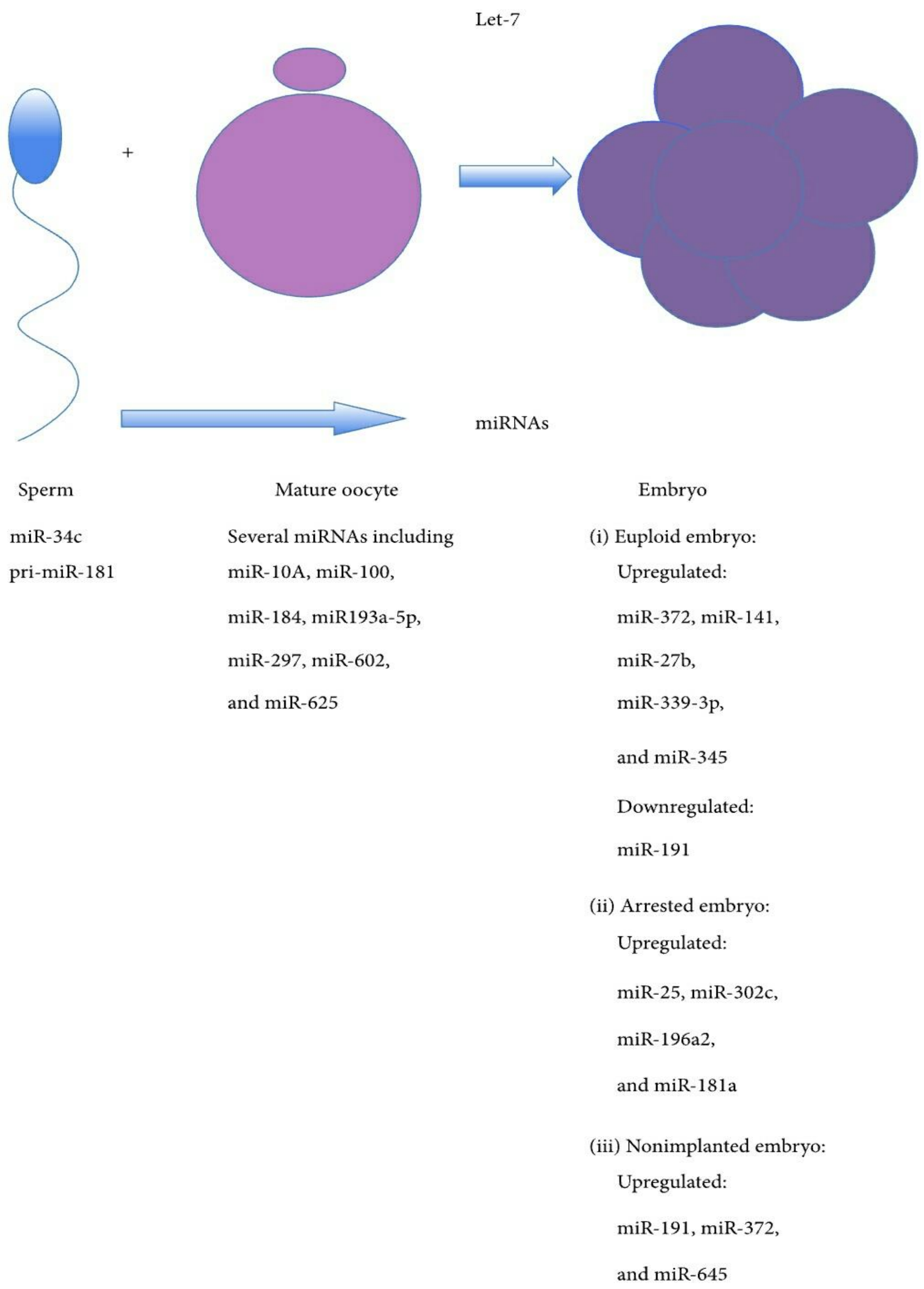
Επιπλέον είναι γνωστό ότι το let-7 ρυθμίζει την μοίρα των αιματοποιητικών βλαστικών κυττάρων σε συνεργασία με τα miR-99a/100, miR-125b-1/2 και LIN28D. Το σύμπλεγμα 1-a (let-7a-2, miR-100, miR-125b-1) και το σύπλεγμα 1-b (**let-7c**, miR-99a, miR-125b-2) εμπλέκονται στην ομοιόσταση HSPC (hematopoietic stem and progenitor cell - αιματοποιητικό στέλεχος και προγονικό κύτταρο) όπως η αυτοανανέωση, ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση μέσω αποκλεισμού της οδού του TGFβ και της ενίσχυσης της σήμανσης Wnt, ενώ το LIN28D καταστέλλει το let-7 ώστε με την σειρά του να αναστείλει την ερυθροειδής ανάπτυξη και να διατηρήσει το στέλεχος. Ο ρόλος των μελών της οικογένειας let-7 στην ανάπτυξη των θηλαστικών δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως , επειδή σε μεγάλο βαθμό είναι τεχνικά δύσκολο να συναντήσει πολλά μέλη της οικογένειας let-7 στο ίδιο άτομο. Επιπροσθέτως, αυτά τα πολλαπλά μέλη μπορεί να έχουν λειτουργικά περιττούς ρόλους. Τέλος, έρευνες επισήμαναν πως τα miRNAs και ειδικότερα τα let-7 γονίδια διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στην νευρογένεση, την ωρίμανση νευρώνων, την δενδριτική αρθροποίηση, την αναγέννηση νευραξόνων και κυρίως την ανάπτυξη και πλαστικότητα του εγκεφάλου.[49,50]

4.3 Συσχέτιση let-7 και Υπογονιμότητας

Η νέα γνώση και μεθοδολογία για τα miRNAs μπορεί να προσφέρει κάποιους νέους βιοδείκτες γυναικείας υπογονιμότητας από διαφορετικές απόψεις: από την φυσιολογία των ωοθηκών εώς την ποιότητα των ωαρίων και εμβρύων, το δυναμικό εμφύτευσης εμβρύου και την δεκτικότητα του ενδομητρίου. Ένας σημαντικός στόχος παραμένει να μελετηθούν τα αίτια του μειωμένου αποθεματικού των ωοθηκών , επειδή δεν υπάρχουν διαθέσιμοι σχετικοί βιοδείκτες για την εκτίμηση του αποθεματικού των ωοθηκών σε γόνιμες γυναίκες και για την πρόβλεψη (ή εξήγηση) του αποτελέσματος υποβοηθούμενης σύλληψης. Τα miRNAs φαίνονται να είναι ένα εξαιρετικά ενδιαφέρον εργαλείο για να πραγματοποιηθεί αυτό. Μερικά από αυτά τα miRNAs, μπορούν εύκολα να ανιχνευθούν στην κυκλοφορία του αίματος και να χρησιμοποιηθούν ως αξιόπιστοι βιοδείκτες ενδιαφέροντος για την φροντίδα της υπογονιμότητας. Τα δεδομένα δείχνουν ότι τα miRNAs μπορούν να ελέγξουν τις αναπαραγωγικές λειτουργίες με αυξημένη ή ανασταλτική απελευθέρωση προγεσταγόνου, ανδρογόνων και οιστρογόνων ωοθηκών σε ανθρώπινα κοκκώδη κύτταρα.

Η αύξηση της ηλικίας των γυναικών είναι ο κύριος παράγοντας μείωσης της γυναικείας γονιμότητας και του αποτελέσματος της υποβοηθούμενης σύλληψης. Αν και οι μηχανισμοί δεν είναι ακόμα απόλυτα κατανοητοί έχει βρεθεί ότι η γήρανση των γυναικών μεταβάλλει την έκφραση ποικιλίας γονιδίων σε ανθρώπινα σωματικά κύτταρα που είναι απαραίτητα για την ποιότητα ωοκυττάρων και πιθανούς στόχους συγκεκριμένων miRNAs που έχουν ταυτοποιηθεί προηγουμένως σε κοκκώδη κύτταρα όπως miR-425, miR-744, miR-146b και let-7d για γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας (<30 ετών) και μέσης ηλικίας (31-34 ετών) και miR-202 και let-7e για γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας (> 37 ετών).

Επί του παρόντος, οι μελέτες με ζωικά μοντέλα δείχνουν ότι κάποιες υποβέλτιστες διαδικασίες όπως η in vitro ωρίμανση ωοθυλακίων θα μπορούσαν να βελτιωθούν χρησιμοποιώντας miRNAs. Η διαμόλυνση κοκκωδών κυττάρων ποντικού με αλληλουχίες let-7c, miR-27-a και miR-322 αναστολέα αύξησε τον ρυθμό ωρίμανσης ωοκυττάρων κατά 1,5 εώς 2 φορές σε σύγκριση με τον έλεγχο κατά την διάρκεια in vitro ωρίμανσης των ωοθυλακίων του ποντικού. Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι η σύνθετη ρύθμιση των miRNAs στα κοκκώδη κύτταρα μπορεί να βελτιώσει την αποτελεσματικότητα ωρίμανσης των ωοκυττάρων κατά την διάρκεια ανάπτυξης ωοθυλακίων in vitro.[52]



<u>Εικόνα 14</u>: miRNAs σε ανθρώπινο σπέρμα , ώριμα ωάρια και έμβρυα, σημαντικά για γονιμοποίηση και ανάπτυξη εμβρύων. Άφθονα miRNAs της οικογένειας let-7 εμπλέκονται στην μετάβαση ωοκυττάρου – εμβρύου.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Βιολογικό Ερώτημα

Η παρούσα διπλωματική εργασία εστιάζει στο κατά πόσο σχετίζεται το γονίδιο let-7c με την υπογονιμότητα και αν εκφράζεται ή όχι σε δείγματα κοκκωδών κυττάρων γυναικών που κατέφυγαν σε μεθόδους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Στην σύγχρονη επιστημονική βιβλιοφραφία, υπάρχει κενό ως προς τον ρόλο του γονίδιο let-7c στον χώρο της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Αυτό, κυρίως, οφείλεται στο γεγονός ότι το ενδιαφέρον των επιστημόνων έχει στραφεί στην μελέτη ολόκληρης της οικογένειας let-7 και των miRNAs γενικότερα. Το βιολογικό ερώτημα που, συνεπώς, προκύπτει μελετώντας και την υπάρχουσα βιβλιογραφία είναι κατά πόσο μπορεί να δημιουργηθεί ένα γενετικό προφίλ σε υπογόνιμες γυναίκες, οι οποίες ενδεχομένως εκφράζουν το γονίδιο let-7c και κατά πόσο θα μπορούσαμε να το συνδέσουμε με την υπογονιμότητα σε ευρύτερο πλαίσιο. Η επιλογή της μελέτης αυτής σε κοκκώδη κύτταρα δεν είναι τυχαία καθώς η ομάδα κυττάρων αυτή αποτελεί τον «καθρέφτη» του ωαρίου και της ικανής αναπαραγωγικής ικανότητας μιας γυναίκας. Η μελέτη αυτή, παρά το μικρό εύρος πληροφοριών που υπάρχει στον ερευνητικό χώρο, θα προσπαθήσει να καταλήξει σε ένα συμπέρασμα και να ερευνήσει την σπουδαιότητα που ενδεχομένως να έχει το γονίδιο let-7c ως εργαλείο στην μελέτη της υπογονιμότητας καθώς και αν τα miRNAs let-7 μπορούν να αποτελέσουν γενικότερα βιοδείκτες της ποιότητας του ωαρίου - ωοθυλακίου.

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

Πειραματική Διαδικασία

Κατά την παρούσα εργασία μελετήθηκε η έκφραση του γονιδίου let-7c σε κοκώδη κύτταρα γυναικών που υποβλήθηκαν σε τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.

Η πειραματική διαδικασία περιελάμβανε τα εξής βήματα:

- Συλλογή, μελέτη και συντήρηση δειγμάτων
- Εξαγωγή και απομόνωση ολικού RNA από τα κοκώδη κύτταρα
- Εφαρμογή cDNA- complementary DNA
- Real-time PCR
- Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Όλα τα παραπάνω βήματα αναλύονται εκτενέστερα παρακάτω.

Συλλογή δειγμάτων

Η διαδικασία της ωοληψίας πραγματοποιήθηκε στο Γ.Π.Ν ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ, όπου απομονώθηκαν τα κοκκώδη κύτταρα από τα ωάρια γυναικών, οι οποίες προσήλθαν για να υποβληθούν σε διαδικασίες υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Τα δείγματα των γυναικών διατηρήθηκαν σε καλλιεργητικό υλικό και καταψύχθηκαν στους -80^{o}C έως ότου χρησιμοποιήθηκαν για την πειραματική διαδικασία.

Μετά την διαδικασία της ωοληψίας το ωάριο μαζί με τα κοκκώδη κύτταρα που το περιβάλλουν παραμένουν σε καλλιεργητικό υλικό για 1 ώρα περίπου, σε συγκεκριμένες συνθήκες περιβάλλοντος, προτού υποβληθούν σε ενζυμική κατεργασία, όπου με προσθήκη υαλουρονιδάσης, απομακρύνονται τα κοκκώδη κύτταρα από το ωάριο. Με την χρήση ειδικής μικροπιπέττας επιτυγχάνεται η πολύ ευαίσθητη και σημαντική αυτή η λήψη κυττάρων.

Βήμα 1ο : Εξαγωγή RNA

Αρχή Μεθόδου

Η τεχνολογία που χρησιμοποιήθηκε για τη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία βασίζεται στη χρήση στηλών μεμβράνης πυριτίου. Η συγκεκριμένες μεμβράνες επιτρέπουν την επιλεκτική και παροδική πρόσδεση του RNA στο εσωτερικό της στήλης. Η αρχή που διέπει αυτή τη μέθοδο έγκειται στο γεγονός ότι σε αυξημένες συνθήκες αλατότητας τα αρνητικά φορτισμένα νουκλεοτίδια εμφανίζουν μεγάλη συγγένεια ως προς τα θετικά φορτισμένα μόρια πυριτίου της μεμβράνης, η σχέση αυτή οδηγεί σε δέσμευση τους στο εσωτερικό της. Η δέσμευση αναστρέφεται παρουσία αλκαλικού διαλύματος χαμηλής ιοντικής ισχύς Η χρήση αυτής τεχνολογίας έχει απλοποιήσει σε σημαντικό βαθμό τη διαδικασία της απομόνωσης γι’ αυτό και τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται ολοένα και περισσότερο.

Ένα από τα κυρίαρχα προβλήματα που πρέπει να υπερκεραστεί κατά τη διαδικασία της απομόνωσης του RNA, είναι αυτό της πιθανής αποδόμησής του . Η αποδόμηση αυτή πραγματοποιείται από ένζυμα, τις ριβονουκλεάσες (RNases), οι οποίες ανευρίσκονται παντού στο περιβάλλον, καθιστώντας έτσι σχεδόν απίθανη τη μη εύρεση τους στο διάλυμα. Για το λόγο αυτό το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε πέρα από την ιδιότητα του να κρατά ένα σταθερό pH κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, εξασφαλίζει την αναστολή των παραπάνω ένζυμων χάρις στην υψηλή συγκέντρωση χαοτροπικών αλάτων. Επιπλέον η υψηλή αυτή συγκέντρωση των χαοτροπικών παραγόντων στο ρυθμιστικό διάλυμα εξασφαλίζει τη λύση των κυττάρων και δημιουργεί τις απαραίτητες συνθήκες αλατότητας για τη πρόσδεση του RNA στη γέλη πυριτίου. Η παρουσία του DNA που και αυτό θα προσδεθεί αρχικά στη μεμβράνη εξαλείφεται με τη χρήση ανασυνδυασμένων ενζύμων αποδόμησης DNA (rDNase).για να αποδεσμευτεί τελικά το RNA από τη στήλη πρέπει να γίνει σιγά αλλαγή των συνθηκών αλατότητας κα το καθαρό πλέον RNA, κάτω από χαμηλό ιοντικό προφίλ, εκλούεται τελικά με τη χρήση νερού απαλλαγμένου από ριβονουκλεάσες. Ακολουθεί το πρωτόκολλο της διαδικασίας βήμα προς βήμα.

Πρωτόκολλο

Η απομόνωση του RNA έγινε με τη χρήση του kit **NucleoSpin® RNA XS Macherey-Nagel.**

1. Φυγοκέντρηση δειγμάτων και απομάκρυνση υπερκείμενου καλλιεργητικού
2. <u>Λύση και ομογενοποίηση κυττάρων</u> :
   Προσθήκη100μL buffer RA1 και 2 μL TCEP (αναγωγικός παράγοντας) και επακόλουθη μηχανική πίεση με ελαφρύ Vortex (2 x 5 sec)
3. Προσθήκη RNA carrier και Vortex (2 x 5 sec). Ενδείκνυται για μικρές συγκεντρώσεις δείγματος
4. Μεταφορά του διαλύματος σε στήλη με φίλτρο NucleoSpin®Filter που κατακρατά άχρηστα προϊόντα της λύσης των κύτταρων (πρωτεΐνες, φωσφολιπίδια κλπ) και φυγοκέντρηση (11000 rpm για 1 min)
5. <u>Δημιουργία συνθηκών πρόσδεσης νουκλεοτιδίων</u>
   Απόρριψη της στήλης του φίλτρου (Βήμα 4) και ακόλουθη προσθήκη αιθανόλης 70% στο διάλυμα που εξωθήθηκε από το φίλτρο μετά τη φυγοκέντρηση και ανευρίσκεται στη στήλη
6. <u>Πρόσδεση RNA</u>
   Μεταφορά του διαλύματος του προηγούμενου βήματος σε ειδική στήλη NucleoSpin® RNA XS Column που περιέχει το φίλτρο δέσμευσης RNA και φυγοκέντρηση (11000 rpm για 1 min). Μεταφορά του φίλτρου σε νέα στήλη.
7. <u>Αφαλάτωση μεμβράνης</u>
   Προσθήκη 100 μL MDB (Membrane Desalting Buffer) και φυγοκέντρηση (11000 rpm για 1 min)
8. Διαδοχικοί καθαρισμοί-<u>ξεπλύματα</u> (Wash) και στέγνωμα της μεμβράνης
   a) Wash 1: Προσθήκη 100μL Buffer RA2 στη στήλη NucleoSpin® RNA XS Column. Επώαση για 2 min και φυγοκέντρηση (11000 rpm για 1 min). Μεταφορά φίλτρου σε νέα στήλη.

b) Wash 2: Προσθήκη 400μL Buffer RA3 στη στήλη NucleoSpin® RNA XS Column και. φυγοκέντρηση (11000 rpm για 1 min). Απόρριψη υγρού που έχει περάσει τη στήλη.

c) Wash 3: Προσθήκη 200μL Buffer RA3 στη στήλη NucleoSpin® RNA XS Column και. φυγοκέντρηση 11000 rpm για 2 min, ώστε να στεγνώσει η μεμβράνη. Μεταφορά φίλτρου σε tube συλλογής.

10. Έκλουση RNA υψηλής καθαρότητας

Προσθήκη 10 μL H2O (RNase-free), φυγοκέντρηση 11000 rpm για 1 min, συλλογή εκλούματος καθαρού RNA.

Βήμα 2^{ο}: Εφαρμογή cDNA - complementary DNA

Αρχή Μεθόδου

Το συμπληρωματικό DNA (cDNA) είναι ένα μόριο DNA, το οποίο έχει συντεθεί από ώριμο mRNA με την βοήθεια του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης, μιας DNA πολυμεράσης που μπορεί να χρησιμοποιήσει είτε DNA είτε RNA ως πρότυπο. Η σύνθεση του cDNA περιλαμβάνει μία μετατροπή δύο σταδίων (σύνθεση πρώτου και δεύτερου κλώνου) του κεκαθαρμένου RNA σε περισσότερο σταθερό αντίγραφο DNA (cDNA).[53]

Η κατασκευή πλήρους μήκους cDNA βιβλιοθηκών επιτρέπει στους ερευνητές να μελετήσουν την γονιδιακή έκφραση και τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις και να αναλάβουν την ανακάλυψη του γονιδίου. Πρόσφατες εξελίξεις επιτρέπουν την κατασκευή βιβλιοθηκών cDNA υψηλής ποιότητας, με μικρές ποσότητες mRNA. Η προετοιμασία και η αλληλουχία υψηλής ανάκτησης βιβλιοθηκών cDNA από δείγματα μικρού RNA είναι ένα ισχυρό εργαλείο για τον ποσοτικό προσδιορισμό γνωστών μικρών RNA (όπως είναι τα miRNAs) και για την ανακάλυψη νέων ειδών RNA. Αυτή η απλή μέθοδος είναι σημαντική για την κλωνοποίηση βιβλιοθηκών cDNA από μικρές ποσότητες RNA εισόδου και επιτρέπει την δημιουργία εύρους, αποτελεσματικότητας και αναπαραγωγιμότητας βιβλιοθηκών cDNA από αυτές. Αξίζει να τονιστεί, τέλος, ότι η μέθοδος αυτή παρέχει σημαντική βελτίωση στην ευαισθησία σε σύγκριση με προηγούμενες μεθόδους κλωνοποίησης, διατηρώντας παράλληλα την αναπαραγώγιμη ταυτοποίηση διαφορετικών, μικρών ειδών RNA.[54,55]

Πρωτόκολλο

Η cDNA διαδικασία έγινε με την χρήση του kit **PrimeScript™ RT reagent (Perfect Real Time)**. Σύμφωνα με το συγκεκριμένο πείραμα, το αντίστοιχο πρώτοκολλο για 2 step real time RT-PCR και SYBR Green qPCR assay περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα και συστατικά:

1. Προετοιμασία master mix

Reagent	**Amount**
5X PrimeScript Buffer (for Real time)	2 μl
PrimeScript RT Enzyme Mix I	0,5 μl
Oligo dt Primer (50 μM)*1	0,5 μl
Random 6 mers (100 μM)*1	0,5 μl
total RNA	1μl
RNase Free dH_2O	5,5μl
Total	**10 μl*2**

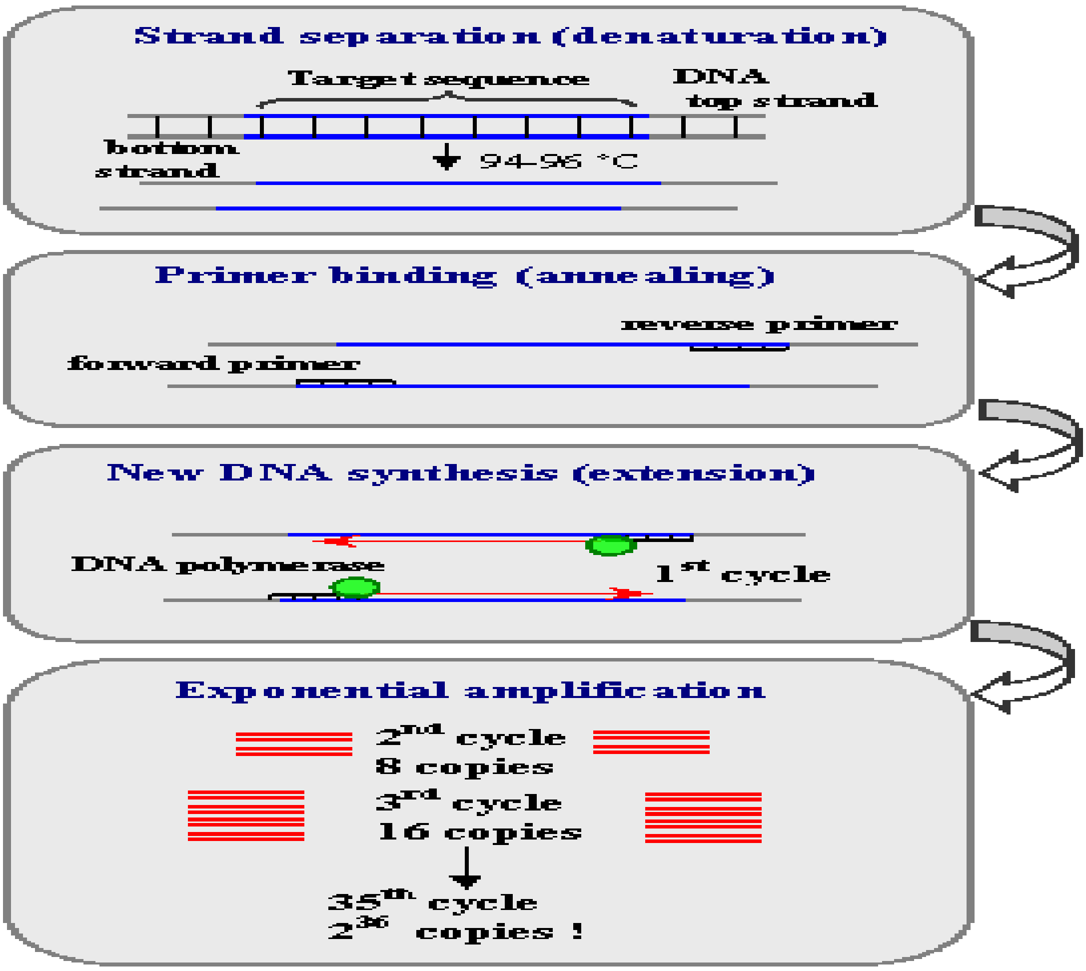
Πίνακας 2: Προετοιμασία master mix

2. Επώαση των δειγμάτων στους 37^{oC} για 17 min στο μηχάνημα **Thermal Cycler Dice™ Touch.**
3. Συντήρηση και φύλαξη δειγμάτων στους -20 ^{oC} .

Βημα 3ο: Εφαρμογή REAL TIME PCR

Αρχή Μεθόδου

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR – Polymerase Chain Reaction) είναι μία επαναστατική μέθοδος που αναπτύχθηκε από τον βραβευμένο με Νόμπελ Kary Mullis την δεκαετία του 80΄. Η PCR βασίζεται στην χρήση της ικανότητας ενός ενζύμου, της DNA πολυμεράσης να συνθέτει έναν νέο κλώνο DNA συμπληρωματικό προς τον κλώνο-πρότυπο. Επειδή η DNA πολυμεράση μπορεί ωστόσο, να συνθέσει έναν μόνο νουκλεοτίδιο σε μία προυπάρχουσα 3΄- OH ομάδα , χρειάζεται ένας εκκινητής στον οποίο θα μπορέσει να προσθέσει αυτό το νουκλεοτίδιο. Αυτή η ανάγκη καθιστά δυνατή την οριοθέτηση μιας συγκεκριμένης περιοχής αλληλουχίας προτύπων, ην οποία ο ερευνητής θέλει να ενισχύσει. [56]



Εικόνα 15: Βασική αρχή της PCR

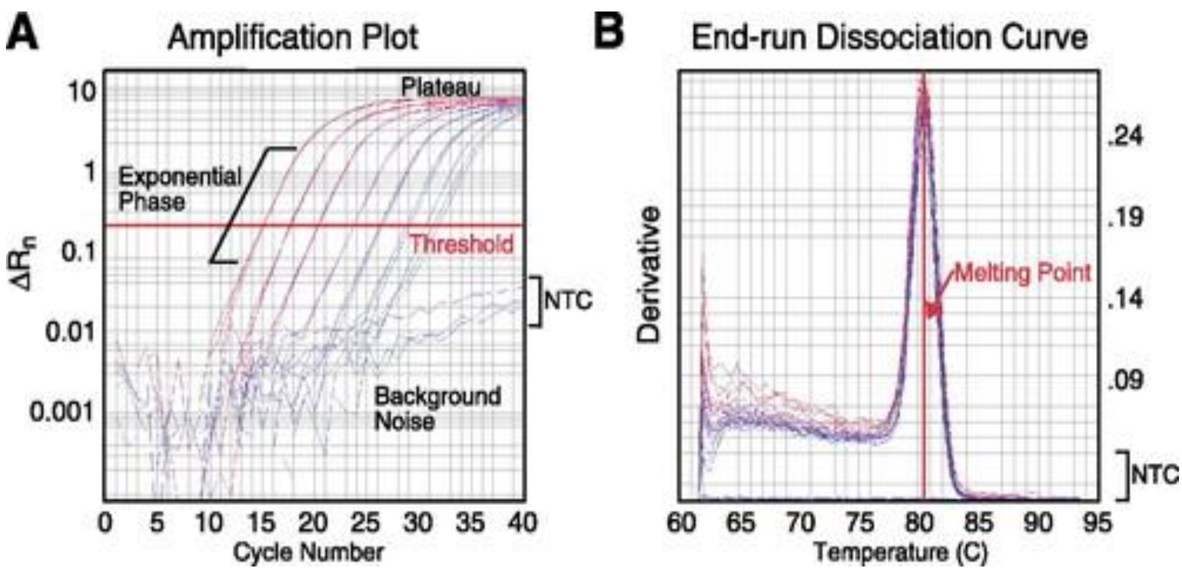
Τα περιεχόμενα της PCR

DNA template - το DNA του δείγματος που περιέχει την αλληλουχία – στόχο. Στην αρχή της αντίδρασης, εφαρμόζεται υψηλή θερμοκρασία στο αρχικό μόριο διπλής έλικας DNA για να διαχωριστούν οι κλώνοι από την ***DNA πολυμεράση*** (ένας τύπου ενζύμου, που συνθέτει νέους κλώνους DNA συμπληρωματικό προς την αλληλουχία – στόχο). Το πρώτο και συνηθέστερα χρησιμοποιούμενο από αυτά τα ένζυμα είναι η DNA πολυμεράση Taq (από το Termis aquaticus), ενώ η DNA πολυμεράση Pfu (από Pyrococcus furiosus) χρησιμοποιείται ευρέως λόγω της μεγάλης πιστότητάς της κατά την αντιγραφή του DNA. Αν και αυτά τα ένζυμα είναι διακριτικά διαφορετικά, έχουν δύο ικανότητες που τα καθιστούν κατάλληλα για PCR: 1) μπορούν να παράγουν νέους κλώνους DNA χρησιμοποιώντας πρότυπο DNA και

εκκινητές και 2) είναι ανθεκτικοί στην θερμότητα. Η πολυμεράση αρχίζει να συνθέτει νουκλεοτίδια (dNTPs ή τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια), μοναδικές μονάδες των βάσεων A, T, C και G, οι οποίες ουσιαστικά αποτελούν «δομικά στοιχεία» νέων κλώνων DNA.

Περιορισμοί PCR – Real Time Pcr

Η αντίδραση της PCR αρχίζει να παράγει αντίγραφα της αλληλουχίας στόχου εκθετικά. Λόγω των αναστολέων της αντίδρασης πολυμεράσης που βρέθηκαν στο δείγμα, ο περιορισμός του αντιδραστηρίου, η συσσώρευση πυροφωσφορικών μορίων και η αυτοσυγκόλληση του συσσωρευμένου προϊόντος, η αντίδραση PCR σταματά τελικά να ενισχύσει την αλληλουχία στόχο με εκθετικό ρυθμό και εμφανίζεται ένα φαινόμενο "plateau" καθιστώντας την ποσοτικοποίηση του τελικού σημείου των προϊόντων PCR αναξιόπιστη. Αυτό το χαρακτηριστικό της PCR καθιστά αναγκαία την ύπαρξη της Real Time Pcr.[56]



<u>Εικόνα 16</u>: Τυπικά αποτελέσματα PCR σε πραγματικό χρόνο.

Διάκριση Real Time PCR με βάση το αρχικό υπόστρωμα

Ανάλογα με το υπόστρωμα (template) που θα χρησιμοποιηθεί για να αποτελέσει τη πρότυπη πηγή γενετικού υλικού, πάνω στην οποία θα βασιστεί η PCR, διακρίνουμε τη ποσοτική PCR σε δύο κατηγορίες. Είναι προφανές ότι δύο τα πιθανά υποστρώματα (α) το DNA και (β) το RNA. Αυτό που ίσως μπερδέψει τον αναγνώστη, σε πρώτη ανάγνωση, είναι το πώς θα πραγματοποιηθεί η όλη διαδικασία στη περίπτωση του RNA, αφού είναι γνωστό ότι η PCR ενισχύει τμήματα DNA και όχι RNA, κάτι που θα αποσαφηνιστεί στη συνέχεια της ενότητας.

Η διάκριση που γίνεται αφορά στα βήματα που θα πραγματοποιηθεί η διαδικασία από τη στιγμή της απομόνωσης του γενετικού υλικού έως τη παραγωγή του προϊόντος. Αρχικά επειδή η τεχνική αυτή αφορά πειράματα έκφρασης το πρώτο βήμα είναι η απομόνωση του ολικού RNA από τον υπο μελέτη πληθυσμό. Με γνώμονα το τελευταίο, η διαδικασία της συγκεκριμένης PCR μπορεί να συμβεί είτε σε ένα είτε σε δύο διακριτά βήματα, διακρίνοντας δύο τύπους

- *One step Real Time PCR (Ενός βήματος)*: Εφόσον έχει πραγματοποιηθεί απομόνωση του RNA, ποσότητα αυτού μεταφέρεται σε tube που περιέχει τα απαραίτητα συστατικά ώστε να συντεθεί, αρχικά η συμπληρωματική αλυσίδα του DNA (cDNA) και εν συνεχεία με βάση αυτή να ξεκινήσει η ενίσχυση του τμήματος στόχου. Πέραν της πολυμεράσης, σε αυτή τη τεχνική περιλαμβάνεται και το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση, που ουσιαστικά ξεκινά την όλη διαδικασία. Η αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου σε ένα βήμα, αποτελεί την ιδανικότερη τεχνική και υπερτερεί συγκριτικά με τη two step PCR, αφού η όλη διαδικασία λαμβάνει χώρα μέσα σε ένα tube, μειώνοντας έτσι τη χρήση πιπέτας, ελαχιστοποιώντας έτσι πιθανά σφάλματα και επιμολύνσεις. Είναι πιο απλή και γρήγορη διαδικασία, ενώ εξασφαλίζει μεγαλύτερη πιστότητα αφοί χρησιμοποιούνται ειδικοί για την επιθυμητή αλληλουχία εκκινητές από τη αρχή. Τέλος μπορεί να πραγματοποιηθεί η ανίχνευση πολλών διαφορετικών γονιδίων ταυτόχρονα, για το ίδιο RNA στο ίδιο πηγαδάκι.

- *Two step Real Time PCR (Δύο βημάτων):* σε αυτή τη περίπτωση ακολουθούνται δύο βήματα πριν παραλάβουμε το προϊόν. Το πρώτο βήμα περιλαμβάνει τη δημιουργία της πρώτης αλυσίδας DNA από το ολικό RNA που έχει απομονωθεί. Σε αντίθεση με τη αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου σε ένα βήμα, εδώ το cDNA προκύπτει από την επεξεργασία ολόκληρου του RNA μη ειδικά, αφού δεν χρησιμοποιούνται ειδικοί για το τμήμα εκκινητές. Ωστόσο αυτό συμβαίνει ούτως ώστε, το cDNA που παραλαμβάνεται να αποτελεί καθρέφτη του συνολικού mRNA, με σκοπό στο ίδιο δείγμα cDNA, να μπορέσει να πραγματοποιηθεί ειδικά η αντίδραση της πολυμεράσης με διαφορετικού εκκινητές κάθε φορά, επιτρέποντας την αναζήτηση περισσοτέρων μορίων στόχων. Είναι προφανές, ότι πρόκειται συγκριτικά για μια χρονοβόρα, σύνθετη διαδικασία που αυξάνει τις πιθανότητες για σφάλματα και επιμολύνσεις. Από την άλλη όμως εμφανίζει πλεονεκτήματα σε σχέση με την αντίδραση ενός βήματος, αφού εδώ υπάρχει αποθήκη cDNA(stock cDNA), ενώ δεν συναντάται δυσκολία στην επίλυση πιθανών προβλημάτων κατά τη φάση RT (reverse transcriptase), όπως πιθανώς να συνέβαινε στην one step. Τέλος είναι πολύ πιο ευαίσθητη από τη one step αφού πραγματοποιείται σε δύο διακριτά βήματα και όχι σε ένα tube.

Διάκριση Real Time PCR με βάση τις φθορίζουσες χρωστικές

Η Real Time PCR πραγματοποιείται με ειδικούς θερμοκυκλοποιητές που ανιχνεύουν φθορισμό. Για να προκύψει φθορισμός κατά τη διάρκεια της αντίδρασης πρέπει να προστεθούν ειδικά μόρια που περιέχουν φθορίζουσες χρωστικές. διαφορετικοί τύπου φθοριζουσών ουσιών επηρεάζουν την ειδικότητα της διαδικασίας, διακρίνοντας δύο κατηγορίες Real Time PCR (α) μη ειδική και (β) ειδική.

Όταν γίνεται λόγος για μη ειδικό σύστημα ανίχνευσης σε μια Real Time PCR, το ρόλο της φθορίζουσας ουσίας αναλαμβάνει η ευρέως χρησιμοποιούμενη χρωστική Sybr Green I. Η συγκεκριμένη χρωστική έχει τη δυνατότητα να συνδέεται στη αύλακα του δίκλωνου DNA και διεγείρεται με ακτινοβολία μήκους κύματος 497-520 nm. Όταν δεν είναι συνδεδεμένη και βρίσκεται ελεύθερη στο διάλυμα δεν παράγει φθορισμό, με το που συνδεθεί όμως τότε ξεκινά να φθορίζει. Όσο αυξάνονται τα ποσοστά δίκλωνων μορίων στην εξέλιξη της αντίδρασης, τόσο αυξάνεται και η χρωστική που ενσωματώνεται σε αυτά άρα τόσο αυξάνει και ο φθορισμός. Έτσι η ένταση του φθορισμού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος. Η μη επιλεκτική πρόσδεση της Sybr Green I, μειώνει την αξιοπιστία της αντίδρασης, αφού μέρος του φθορισμού μπορεί να οφείλεται σε σχηματισμό διμερών εκκινητή καθώς και σε ενδεχόμενα μη επιθυμητά προϊόντα που δύναται να προκύψουν. Αυτά μπορούν να οδηγήσουν σε λάθος συμπεράσματα σχετικά με το επίπεδο φθορισμού και τη ποσότητα του προϊόντος. Από την άλλη αποτελεί μια ευαίσθητη μέθοδο, με κύριο πλεονέκτημα τη χρήση της με οποιοδήποτε ζευγάρι εκκινητών, που επιτρέπει τη μελέτη πλήθους αλληλουχιών ενώ παράλληλα αυτό τη καθιστά οικονομική μέθοδο. Ο φθορισμός πρέπει να ανιχνεύεται και να μετράται από το μηχάνημα στο βήμα της επιμήκυνσης ενώ εξαιτίας της μη ειδικότητας το προϊόν της PCR είτε φορτώνεται σε gel αγαρόζης για ποιοτική ανάλυση και επιβεβαίωση του αποτελέσματος είτε αναλύεται με βάση τις καμπύλες αποδιάταξης (melting curves). Στη πειραματική διαδικασία της συγκεκριμένης εργασίας χρησιμοποιήθηκε η συγκεκριμένη χρωστική.

Σε αντίθεση με τη Sybr Green, οι ειδικές χρωστικές δεν βρίσκονται μόνες τους στο διάλυμα αλλά είναι συνδεδεμένες πάνω σε μικρά τμήματα DNA (ανιχνευτές), τα οποία είναι σχεδιασμένα ώστε να υβριδοποιούνται με το επιθυμητό προς ενίσχυση τμήμα. Οι χρωστικές που προκαλούν ειδικό σήμα ανίχνευσης είναι αναφορικά:

- Hybridisation Probes
- Taqman Probes
- Molecular beacons
- Scorpions

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Για την μελέτη του γονιδίου let-7c σχεδιάστηκαν ειδικοί εκκινητές που δεσμεύονταν αποκλειστικά μόνο στο υπό μελέτη γονίδιο. Για την ενίσχυση του γονιδίου και την ανάλυση των αποτελεσμάτων εφαρμόστηκε η διαδικασία της two step Real Time Pcr και η μέθοδος ανίχνευσης που επιλέχθηκε ήταν της χρωστικής Sybr Green I. Ο θερμοκυκλοποιητής που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο Light Cycler Real-Time PCR 480 Instrument της εταιρείας Roche. Οι συνθήκες του προγράμματος ενίσχυσης έγιναν με βάση τα απαραίτητα πρωτόκολλα για τη Real Time και το μηχάνημα, ενώ η θερμοκρασία υβριδοποίησης των primers έγινε με βάση των Tm τους.

<u>Εικόνα 17</u>: Θερμοκυκλοποιητής Light Cycler 480

<u>*Υλικά RT- qPCR*</u>

<u>Δομή Εκκινητών</u>

Κριτήριο ως προς το σχεδιασμό τους αποτέλεσαν πέραν της συμπληρωματικότητας και της επιλογής της περιοχής δέσμευσης στο γονίδιο τα ακόλουθα:

- ✓ Μέγεθος 18-22 νουκλεοτιδίων
- ✓ Ποσοστό GC% πρέπει να βρίσκεται κυμαίνεται σε εύρος 40-60%

- ✓ Στο 3’ άκρο της αλληλουχίας κάθε εκκινητή υπάρχει ανάγκη παρουσίας GC (GC Clamp) ώστε να εξασφαλίζεται καλύτερη σύνδεση, αφού γουανίνη και κυτοσίνη συνδέονται ισχυρότερα
- ✓ Πρέπει να αποφεύγονται επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, όπως για παράδειγμα επαναλαμβανόμενα δινουκλεοτίδια στη σειρά (ΑΤΑΤΑΤ) ή/και το ίδιο νουκλεοτίδιο
- ✓ Τιμές της θερμοκρασίας τήξης κάθε εκκινητή Tm στο εύρος 45-60^{0}C.
- ✓ Αποφυγή της συμπληρωματικότητας στους δύο εκκινητές

Η τελική θερμοκρασία Tm δόθηκε από την εταιρεία που τους συνέθεσε (F=60^{o}C & R=53 ^{o}C)

Αντιδραστήρια

- Luna Universal qPCR Mix
- Forward primer (10 μM)
- Reverse primer (10 μM)
- Template DNA
- Nuclease – free Water

Πρωτόκολλο

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε στη διαδικασία της two step RT-qPCR πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και η ποσότητα DNA σταθμίστηκε μετά από σειρά πειραμάτων ,στο 1μL ανά δείγμα. Το πρωτόκολλο έχει ως εξής:

Συστατικά	Ποσότητα (μL) αντίδρασης στα 20 μL ανα δείγμα
Luna Universal qPCR Mix	**10**
Forward Primer (10μM)	**0.5**
Reverse Primer (10μM)	**0.5**
Template DNA	**1**
Nuclease – free Water	**8**

Πίνακας 3: Πρωτόκολλο RT-qPCR

Οι συνθήκες υπό τις οποίες πραγματοποιήθηκε η RT-qPCR στο θερμοκυκλοποιητή προγραμματίστηκαν σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο και πάντα με γνώμονα τις οδηγίες της εταιρείας και του μηχανήματος:

CYCLE STEP	TEMPERATURE	TIME	CYCLES
Αρχική Αποδιάταξη	**95 ^{o}C**	**60 sec**	**1**
Αποδιάταξη Υβριδοποίηση Ενισχυση	**95 ^{o}C 57 ^{o}C 60 ^{o} C**	**15 sec 20 sec 30sec**	**40-45**
Ψύξη	**40 ^{o} C**		**1**

Πίνακας 4: Συνθήκες αντίδρασης

Κάθε δείγμα μόλις ετοιμαστεί τοποθετείται σε ειδική μικροπλακέτα, η οποία εν συνεχεία σφραγίζεται, φυγοκεντρείται (2500rpm/1min) και στη συνέχεια τοποθετείται στο μηχάνημα έτοιμη για να ξεκινήσει η διαδικασία. Μετά το πέρας της διαδικασίας ακολουθείται ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης (3%) για ποιοτική ανάλυση του προϊόντος της αντίδρασης. Αναφορικά με το τελευταίο το προϊόν που προκύπτει από την αντίδραση της ενίσχυσης με βάση τη σύνδεση των εκκινητών αναμένεται να έχει μέγεθος 70 bp, οπότε η ζώνη του DNA στο gel πρέπει να εμφανίζεται σε αυτό το ύψος.

Ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια ευρέως διαδεδομένη τεχνική για την ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων και των πρωτεϊνών. Βασίζεται στον διαχωρισμό φορτισμένων μορίων (π.χ. DNA) κατά μήκος ενός στερεού πορώδους υποστρώματος στα άκρα του οποίου εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο, όποτε μέσω του ηλεκτρικού ρεύματος που διατρέχει το μέσο, τα φορτισμένα σωματίδια κινούνται προς τα ηλεκτρόδια με διαφορετικές ταχύτητες ανάλογα με το φορτίο τους, έτσι το DNA κινείται προς το θετικό πόλο, και αντιστρόφως ανάλογα με το μέγεθός τους. Έτσι τα περισσότερο φορτισμένα και μικρότερα μόρια απομακρύνονται περισσότερο από το αρχικό τους σημείο, ενώ τα λιγότερο φορτισμένα και μεγαλύτερα σε μέγεθος μόρια απομακρύνονται λιγότερο. Κατάλληλες τεχνικές επιτρέπουν την οπτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων με ειδικές χρώσεις, με παρατήρηση σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας ή με αυτοραδιογραφία.

Στη συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 3%. Η επιλογή της συγκεκριμένης συγκέντρωσης πηκτώματος, αποφασίστηκε με γνώμονα το μικρό μήκος του προϊόντος PCR, 70bp.

Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης διακρίνεται σε τρία στάδια:

1. Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης επιθυμητής συγκέντρωσης (1-4%) και κατάλληλης χρώσης Προετοιμασία των δειγμάτων με διάλυμα φόρτωσης και τοποθέτηση τους στις ειδικές θέσεις στο πήκτωμα
2. Εφαρμογή κατάλληλης ηλεκτρικής τάσης για το βέλτιστο χρόνο διαχωρισμού του δείγματος και παρατήρηση του gel υπό UV

Πρόκειται για μια απλή διαδικασία που αρχικά περιλαμβάνει τη ζύγιση σκόνης αγαρόζης, όπου εδώ ήτανε 3gr στη συνέχεια διάλυση της σε ένα ρυθμιστικό μέσο TBE (100ml). Θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων ώστε να ομογενοποιηθεί έως ότου το διάλυμα να γίνει διαυγές. Άμεση προσθήκη ειδικής χρωστικής. Χρησιμοποιήθηκε βρωμιούχο αιθίδιο (10μL), που μπορεί να φθορίζει υπό UV. Αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου μέσα σε ειδικό εκμαγείο, έως στερεοποίησης του. Στη συνέχεια εμβαπτίζεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης περιμένοντας τα δείγματα για φόρτωση.

Η προετοιμασία των δειγμάτων περιελάμβανε τη συνολική ποσότητα που παρελήφθει μετά το τέλος της PCR (20μL) όπου προστίθενται διάλυμα φόρτωσης (Loading Buffer / 8μL). Ενώ ξεχωριστά μόνος του προστίθενται ο μάρτυρας (Ladder 100bp)

Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στο μηχάνημα είναι 91 Volt, 90 mA για διάστημα 45 min.

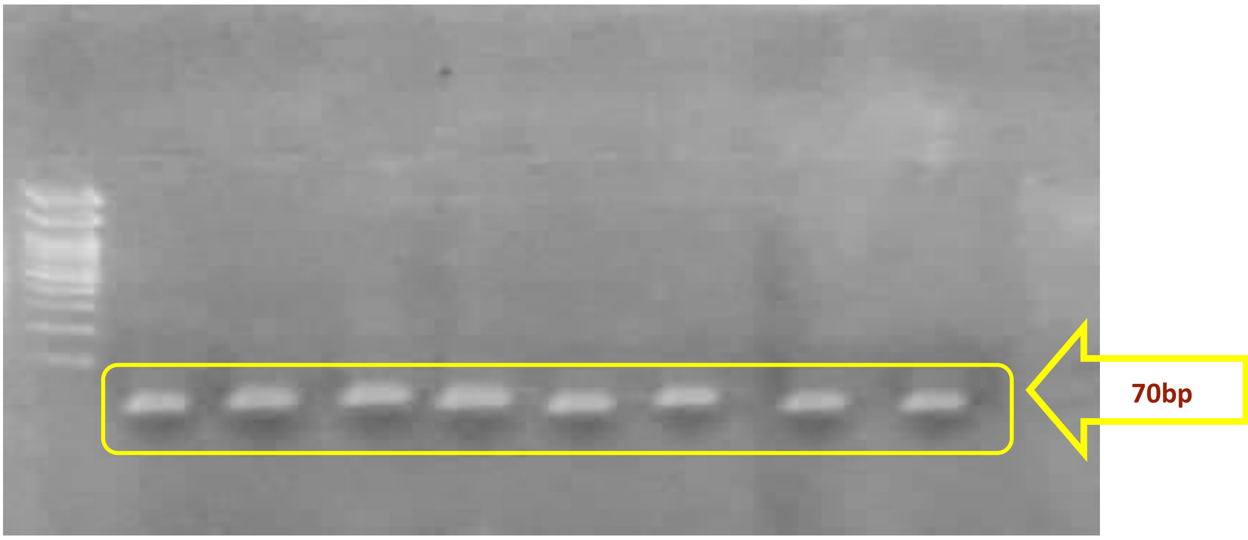
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Διαχωρισμός Δειγμάτων

Τα κοκκώδη κύτταρα που χρησιμοποιήσαμε στην παρούσα διπλωματική, απομονώθηκαν από 25 γυναίκες, οι οποίες προσήλθαν στο νοσοκομείο για να υποβληθούν σε διαδικασίες υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Στηριζόμενοι στα δημογραφικά στοιχεία και τα λοιπά ιατρικά αρχεία που συλλέχθηκαν από τους φακέλους των γυναικών κατόπιν κατοχυρωμένης, επίσημης, έγγραφης συναίνεσης, προσπαθήσαμε να βγάλουμε την οποιαδήποτε συσχέτιση σε δείγματα που δεν είχαν ή είχαν μικρή έκφραση του υπό μελέτη γονιδίου let-7c.

Επιβεβαίωση προϊόντων Real-Time PCR

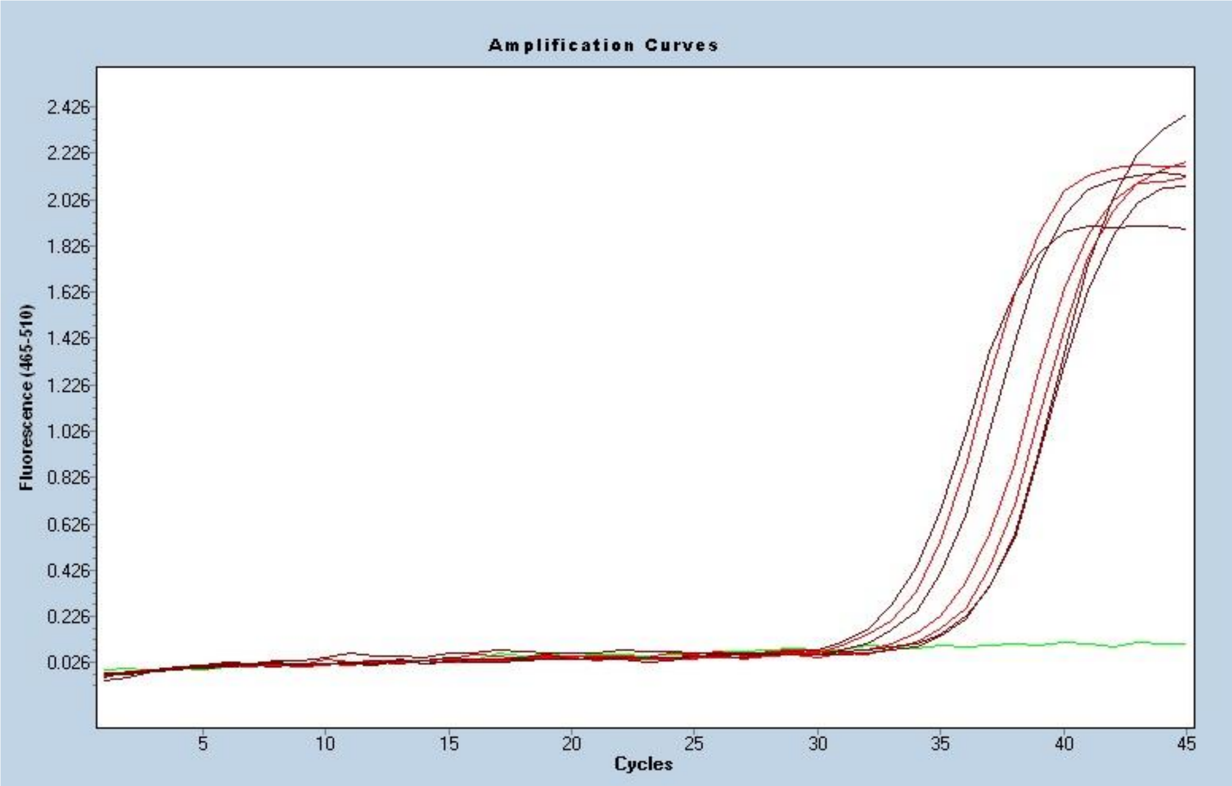
Όπως ήδη έχει αναφερθεί οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τη qPCR, σχεδιάστηκαν έτσι, ώστε να πιάνουν ειδικά μόνο το υπό μελέτη γονίδιο (let-7c). Ωστόσο, εξαιτίας του γεγονότος ότι η τεχνική της Real Time PCR πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της χρωστικής SYBR Green I, η οποία καθιστά τη διαδικασία μη ειδική, κρίθηκε απαραίτητο να ταυτοποιηθεί το προϊόν της αντίδρασης ως προς το αναμενόμενο προϊόν που θα ενισχυόταν θεωρητικά κατά το σχεδιασμό των εκκινητών. Δεδομένου ότι, η Real Time PCR είναι ποσοτική τεχνική κάθε φορά με το πέρας της διαδικασίας ακολουθούσε ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR σε πηκτή αγαρόζης 3%, με σκοπό την εύρεση μοναδικής ζώνης ανάλογης του προϊόντος που αναμένεται. Με αυτό τον τρόπο γίνεται η επιβεβαίωση του αποτελέσματος με ασφάλεια.



Εικόνα 18: **Επαλήθευση αποτελέσματος προϊόντος ενίσχυσης**

Αποτελέσματα Real Time PCR

Σε μια αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου, η διαδικασία της ενίσχυσης μπορεί να παρατηρηθεί τη στιγμή που συμβαίνει μέσω ειδικού λογισμικού που διαβάζει τον παραγόμενο φθορισμό κατά την εξέλιξη της αντίδρασης. Η πορεία της αντίδρασης καθώς και το τελικό αποτέλεσμα αυτής, εμφανίζεται και παρουσιάζεται από το λογισμικό με μορφή καμπύλης. Ο κάθετος άξονας δείχνει τις τιμές της απορρόφησης φθορισμού ενώ ο οριζόντιος τους κύκλους του προγράμματος της PCR. Όταν ο φθορισμός που προσμετράται, ξεπεράσει ένα κατώτατο ορισμένο επίπεδο, κάτι που επαγωγικά φανερώνει ικανή ποσότητα αντιγράφων, τότε ξεκινά η εκθετική φάση και η τιμή αυτή καλείται Cp (crossing point) και είναι μέτρο σύγκρισης και υπολογισμού της πορείας κάθε δείγματος. Κάθε φορά που κύκλοι παρατηρείται ένα Cp δίνεται μια καλή ένδειξη για το επίπεδο έκφρασης του προϊόντος συγκριτικά με τα υπόλοιπα δείγματα και με βάση πάντα ένα γονίδιο αναφοράς. Όσο λιγότερα αντίγραφα περιέχονται σε ένα δείγμα, τόσο περισσότεροι απαιτούνται ώστε να εισέλθει σε εκθετική φάση η αντίδραση και να ανιχνευτεί το σήμα που αντιστοιχεί στο ρυθμό αύξησης της συγκέντρωσης του προϊόντος. Έτσι μικρότερα Cp αντιστοιχούν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αντιγράφων ανά δείγμα συγκριτικά με μεγαλύτερα Cp όπου προφανώς ισχύει το αντίθετο.



Εικόνα 19 : Καμπύλες Real Time PCR

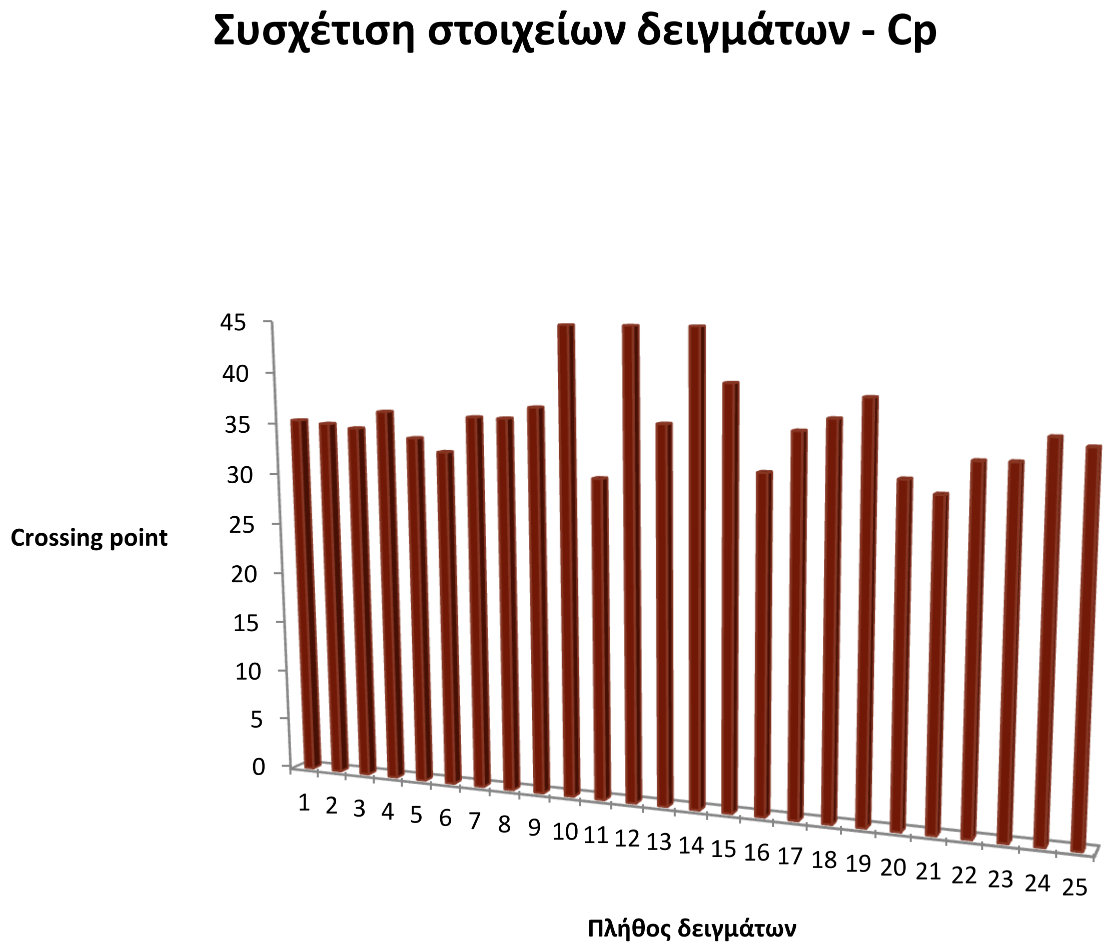
Στην εικόνα παρατηρούμε υψηλά Cp των δειγμάτων άρα χαμηλή έκφραση του γονιδίου. Τα δεδομένα για το γονίδιο let-7c στα 25 δείγματα που αντλήθηκαν και των Cp που λάβαμε από τη διαδικασία της Real Time PCR εμφανίζονται στον πίνακα που ακολουθεί:

ΓΥΝΑΙΚΕΣ	Cp
1	35,43
2	35,17
3	34.82
4	36,52
5	34,05
6	32,81

7	36,24
8	36,21
9	37,33
10	45
11	30,89
12	45
13	36,15
14	45
15	40
16	32,06
17	35,89
18	37,07
19	39,01
20	31,96
21	30,75
22	33,79
23	33.81
24	36,05
25	35,29

Πίνακας 5: Αναλυτικά Στοιχεία δειγμάτων - Cp

Συμπερασματικά λοιπόν, παρατηρούμε ότι σε υπογόνιμες γυναίκες το γονίδιο let-7c φαίνεται να παρουσιάζει πολύ μικρή τάση έκφρασης.



Εικόνα 20: Συσχέτιση Cp- πλήθος δειγμάτων

Στο διάγραμμα επιβεβαιώνεται η χαμηλή τάση έκφρασης του υπό μελέτη γονιδίου καθώς τα Cp (Crossing points) και των 25 δειγμάτων έχουν τιμή 30 και πάνω. Μεγαλύτερα Cp, όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, αντιστοιχούν σε μικρότερες συγκεντρώσεις αντιγράφων, άρα και σε χαμηλή έκφραση γονιδίου.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα microRNAs, αδιαμφισβήτητα αποτελούν αντικείμενο μελέτης και έρευνας καθώς πρόσφατες και όχι μόνο μελέτες, υποστηρίζουν την ιδέα ότι διαθέτουν πολλαπλούς ρόλους τόσο στην γυναικεία όσο και στην ανδρική υπογονιμότητα. Εστιάζοντας στον γυναικείο πληθυσμό, βασικός ρόλος των miRNAs μοιάζει να είναι εκείνος που σχετίζεται με την ρύθμιση της ωοθυλακιογένεσης. Εξαιτίας των πολλαπλών και σημαντικών ρόλων που έχουν τα κοκκώδη κύτταρα τόσο στην διαδικασία της ωοθυλακιογένεσης αλλά και στην ανάπτυξη το ωχρού σωμάτιου πολλά πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε κοκκώδη κύτταρα και προσπάθησαν να καταλήξουν σε σύνδεση γυναικείας υπογονιμότητας και miRNAs. Από τα πιο υψηλά εκφραζόμενα miRNAs σε κοκκώδη κύτταρα (cumulus cells) ήταν το miR-21, miR-155 και πολλά μέλη της οικογένειας let-7. [57]

Η οικογένεια let-7 των miRNAs φαίνεται να είναι πολλά υποσχόμενη, καθώς τα γονίδια που προέρχονται από εκεί μπορούν να λειτουργήσουν ως βοηθητικά όπλα στην γυναικεία και όχι μόνο υπογονιμότητα.

Σύμφωνα με μελέτες που πραγματοποιήθηκαν, άφθονα miRNAs της οικογένειας hsa-let-7, φαίνεται να εμπλέκονται στην ρύθμιση της κυήσεως, στην ανάπτυξη ωοθυλακίων, στην στερεοειδογένεση κυττάρων ωοθηκών, στην ανάπτυξη καρκίνου ωοθηκών καθώς και στην απόκριση ορμονών. Πιο συγκεκριμένα, το γονίδιο let-7f έχει περιγραφεί ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο στις κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού και ως ρυθμιστής, που ελέγχει την στεροειδογένεση των κυττάρων των ωοθηκών. Το γονίδιο let-7b βρέθηκε ότι συμμετέχει στην εξέλιξη των ωοθυλακίων invitro και κρίθηκε αναγκαίο για την φυσιολογική ανάπτυξη του ωχρού σωματίου σε ποντίκια.[58]

Το γονίδιο let-7c κωδικοποιείται στο χρωμόσωμα 21 στους ανθρώπους και σύμφωνα με έρευνες δύναται να υπερεκφραστεί στον ανθρώπινο εγκέφαλο στην Τρισωμία 21 (T21), μια πολύπλοκη νευροαναπτυξιακή διαταραχή, η οποία δημιουργεί το λεγόμενο σύνδρομο Down. Σύμφωνα με πρόσφατες εξελίξεις στον χώρο της Βιολογίας και συγκεκριμένα των βλαστικών κυττάρων, το let-7c φαίνεται ότι διαμεσολαβεί σε σημαντικές, ρυθμιστικές, επιγενετικές λειτουργίες που ελέγχουν την ανάπτυξη και την λειτουργική δραστηριότητα των ανθρώπινων νευρωνικών κυττάρων.[59]

Το miRNA-let7c αποτελεί διαγνωστικό μέσο και στον εντοπισμένο καρκίνο του προστάτη, όπου παρατηρείται υπερέκφραση αυτού μαζί με τα miRNAs100 και 208.[60] Αν και στον τομέα της υπογονιμότητας φαίνεται πως υπάρχει ένα βιβλιογραφικό κενό όσον αφορά τον ξεκάθαρο ρόλο του γονιδίου let-7c , έρευνα που πραγματοποιήθηκε στο Ισραήλ εν έτει 2014, προσπάθησε να συσχετίσει την μεταβολή έκφρασης των miRNAs σε ασθενείς με πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια (Premature Ovarian Failure, POF), κύρια αιτία υπογονιμότητας σε γυναίκες ηλικίας κάτω των 40 ετών. Τα αποτελέσματα έδειξαν αυξημένη έκφραση των miR-202, miR-126, miR-146a σε γυναίκες που είχαν πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια και μόνο δύο γονίδια παρουσίασαν μειωμένη έκφραση, το γονίδιο let-7c και το miR-144.[61]

Έρευνα που πραγματοποιήθηκε το 2018 σε 52 γυναίκες προσπάθησε να συσχετίσει το γονίδιο let-7c με τον καρκίνο των ωοθηκών, καθώς το γονίδιο αυτό εμπλέκεται σε πολλαπλές βιολογικές διεργασίες, που περιλαμβάνουν τον πολλαπλασιαμό των κυττάρων, την διαφοροποίηση, την απόπτωση και την ογκογένεση. Τα αποτελέσματα έδειξαν μειωμένη έκφραση του γονιδίου σε γυναίκες που είχαν καρκίνο των ωοθηκών ενώ παλαιότερες μελέτες αναφέρουν μειωμένη έκφραση του ίδιου γονιδίου και σε γυναίκες με καρκίνο του μαστού. Το miRNA-let7c είναι άφθονο στις ωοθήκες και φαίνεται πως εξυπηρετεί έναν σημαντικό ρόλο στον αναπαραγωγικό έλεγχο κατά την διάρκεια των αναπτυξιακών σταδίων. [62]

Σύμφωνα με την παρούσα διπλωματική εργασία και τα αποτελέσματα αυτής φαίνεται μία τάση χαμηλής εώς και μηδενικής έκφρασης του γονιδίου let-7c στα κοκκώδη κύτταρα υπογόνιμων γυναικών που κατέφυγαν σε μεθόδους Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα βρίσκονται σε συμφωνία με τα δεδομένα που υπάρχουν στην παγκόσμια βιβλιογραφία και αφορούν την υπογονιμότητα και επιτάσσουν την αναγκαιότητα για περαιτέρω διερεύνηση.

Στο σημείο αυτό, αξίζει να τονιστεί η σημαντικότητα και του γονιδίου let-7b της ίδιας οικογένειας με το let-7c που φαίνεται πως εμπλέκονται με σημαντικό τρόπο στον τομέα της υπογονιμότητας και ενδεχομένως να αποτελέσει αντικείμενο συζήτησης και περαιτέρω έρευνας στους τομείς της Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής. Ευρήματα μεγάλης έρευνας αποκάλυψαν ότι το let-7b λειτουργεί ως βιοδείκτης για το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOs). Πιο συγκεκριμένα σε κοκκώδη κύτταρα γυναικών που εμφανίζουν αυτό το σύνδρομο, παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση του γονιδίου let-7b. [63] Το γονίδιο αυτό όμως φαίνεται να εμπλέκεται και στην παθοφυσιολογία της ενδομητρίωσης, καθώς σύμφωνα με έρευνες, φαίνεται ότι λειτουργεί ως θεραπευτικό μέσο για γυναίκες που παρουσιάζουν ενδομητρίωση.[64]

Αυτό που γίνεται κατανοητό μέσα από πολλές μελέτες και αξίζει να τονιστεί είναι ότι τα miRNAs, που απελευθερώνονται στο εξωκυτταρικό περιβάλλον και μεταφέρονται μέσω λιπιδίων ή πρωτεϊνών, είναι ιδιαίτερα σταθερά και αντέχουν σε ακραίες θερμοκρασίες (συντήρηση, κατάψυξη, απόψυξη). Αυτή η ιδιότητα καθιστά τα miRNAs δυνητικούς βιοδείκτες για την ανάπτυξη ωαρίων και εμβρύου. Πιο συγκεκριμένα, τα έμβρυα βοοειδών που καλλιεργούνται in vitro $5^{η}$ με $8^{η}$ ημέρα απελευθερώνουν διαφορετικά miRNAs στα μέσα καλλιέργειας, ανάλογα με την αναπτυξιακή τους ιδιότητα. Σε πρόσφατη μελέτη, αποδείχθηκε το γεγονός ότι ορισμένες ομάδες miRNAs είναι περισσότερο άφθονες στα μέσα καλλιέργειας των εκφυλισμένων εμβρύων από τα έμβρυα των βλαστοκυστών. Τα αποτελέσματα των μελετών επισημαίνουν ότι η έκφραση του miRNA μπορεί να συσχετιστεί με την ικανότητα ανάπτυξης του εμβρύου καθώς και το ότι σε in vitro μέσα καλλιέργειας θα μπορούσε να επιτρέψει την επιλογή καλύτερης ποιότητας εμβρύων με τελικό σκοπό μια επιτυχή εγκυμοσύνη. [65]

Η πρόσφατη ταυτοποίηση των miRNAs ως σταθερών μορίων και στα βιολογικά υγρά, άνοιξε τον δρόμο για την χρήση τους ως νέοι βιοδείκτες στην κλινική διάγνωση. Τα microRNAs στον ορό αλλά και στο πλάσμα αποτελούν ελάχιστα επεμβατικά, διαγνωστικά μέσα δίνοντας την δυνατότητα εφαρμογής πιο ευαίσθητων και συγκεκριμένων δοκιμών από των μέχρι σήμερα διαθέσιμων. Το γεγονός ότι αυτά τα μικρά ρυθμιστικά RNAsμπορούν να ανευρεθούν τόσο στον ορό όσο και στα ωοθυλάκια, τα καθιστά ικανά στο να μας δώσουν σημαντικές πληροφορίες για την διαδικασία της ωορρηξίας, τονίζοντας τον ρόλο τους στην κλινική χρήση Μετά τις πρώτες μελέτες, οι οποίες συσχέτισαν την ύπαρξη συγκεκριμένων miRNAs με τον καρκίνο, ακολούθησαν αρκετές έρευνες που τονίζουν την σημαντική μεταβολή της εικόνας έκφρασης των miRNAs πλάσματος/ορού σε φυσιολογικές καταστάσεις όπως είναι η εγκυμοσύνη αλλά και σε παθολογικές όπως η καρδιακή ανεπάρκεια και η σηψαιμία. [61]

Εν κατακλείδι, κρίνεται σκόπιμη η αναγκαιότητα περαιτέρω ερευνών και πειραματικών μεθόδων με σκοπό να επισφραγίστει η λειτουργία του γονιδίου let-7c στον τομέα της υπογονιμότητας καθώς και οποιοδήποτε άλλο γονίδιο, που ανήκει στην οικογένεια let-7 και μπορεί να βοηθήσει στον τομέα της Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής. Η επικείμενη, νέα γνώση μπορεί να προσφέρει νέους βιοδείκτες για πρόγνωση,ανίχνευση και θεραπεία των διαταραχών γονιμότητας και των εκφυλιστικών ασθενειών στο μέλλον.

Τα miRNAs αντιπροσωπεύουν μια μεγάλη πρόκληση στην αναπαραγωγική και αναγεννητική ιατρική για να κατανοηθεί καλύτερα η προαιμητική ανάπτυξη στους ανθρώπους συμπεριλαμβανομένων των θηλυκών αναπαραγωγικών ιστών, των γαμετών, των εμβρύων και των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων.

Βιβλιογραφία

1. *Vander A., Sherman J., Luciano D., Τσακόπουλος Μ., «Φυσιολογία του ανθρώπου ΙΙ-Μηχανισμοί της λειτουργίας του οργανισμού», 8η Έκδοση, Ιατρικές εκδόσεις Κ. Π. Πασχαλίδης, Αθήνα, 2001, ISBN: 978-960-8122-94-5*

2. *Abraham L. Kierszenbaum, Laura L. Tres, «Ιστολογία με στοιχεία Κυτταρικής Βιολογίας-Εισαγωγή στην Ιστοπαθολογία», Εκδόσεις Broken Hill Publishers Ltd, Λευκωσία (Κύπρος), 2013, ISBN: 978-960-489-240-2*

3. *Leslie P. Gartner, James L. Hiatt, «Colour Textbook of Histology», 3η Έκδοση, Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιανού, 2003, ISBN: 960-394-191-3*

4. *Scott F Gilbert., «Developmental Biology, 6th edition», Sinauer Associates, Sunderland (UK), 2000, ISBN: 0-87893-243-7*

5. *Lunenfeld B et al., «The function of the growing follicle.», J Reprod Fertil., 45(3):567-74, 1975*

6. *Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al., «Morphology and Physiology of the Ovary», Endotext, 2000*

7. *Αναπλιώτου Μ., «Ωοθυλακιογένεση», διαθέσιμο από https://e-endocrinology.gr/*

8. *Devoto L, Kohen P, Muñoz A, Strauss JF 3rd, «Human corpus luteum physiology and the luteal-phase dysfunction associated with ovarian stimulation.», Reprod Biomed Online, 18 Suppl 2:19-24,2019*

9. *Stocco C, Telleria C, Gibori G., «The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression.» , Endocr Rev, 28(1):117-49, 2007*

10. *Cheng-Jie Zhou et al., «The beneficial effects of cumulus cells and oocyte-cumulus cell gap junctions depends on oocyte maturation and fertilization methods in mice», PeerJ., 4: e1761, 2016*

11. *Russell DL, Salustri A., «Extracellular matrix of the cumulus-oocyte complex.», Semin Reprod Med., 24(4):217-27,2006*

12. *Gilula NB, Epstein ML, Beers WH., «Cell-to-cell communication and ovulation. A study of the cumulus-oocyte complex.», J Cell Biol, 78(1):58-75, 1978*

13. *Erickson G., «Follicle Growth and Development», Glob. libr. women's med., ISSN: 1756-2228, DOI 10.3843, 2008*

14. *Albertini DF et al., «Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development.», Reproduction., 121(5):647-53, 2001*

15. *De Sousa PA et al., «Connexin trafficking and the control of gap junction assembly in mouse preimplantation embryos.», Development., 117(4):1355-67, 1993*

16. *Simon AM et al., «Female infertility in mice lacking connexin 37.», Nature., 385(6616):525-9, 1997*

17. *«Infertility definitions and terminology», διαθέσιμο από https://www.who.int/*

18. *«Infertility is a global public health issue», διαθέσιμο από https://www.who.int/*

19 *«Υπογονιμότητα-Εξωσωματική γονιμοποίηση. Ηθικά διλήμματα και προβλήματα», πτυχιακή εργασία διαθέσιμη από https://eclass.teiwm.gr/*

20. *«What is Assisted Reproductive Technology? » , διαθέσιμο από https://www.cdc.gov/*

21. *«Types of assisted reproductive treatment», διαθέσιμο από https://www.varta.org.au/*

22. *«In-vitro fertilization: IVF», διαθέσιμο από https://americanpregnancy.org/*

23. *«Stimulation Protocols», διαθέσιμο από https://ivf-worldwide.com/*

24. *Nasseri S, Ledger WL, «Clomiphene citrate in the twenty-first century.», Hum Fertil (Camb)., 4(3): 145-51, 2001*

25. *David S.Guzick M.D. Ph.D., Anthony Zeleznik Ph.D., «Efficacy of clomiphene citrate in the treatment of luteal phase deficiency: quantity versus quality of preovulatory follicles», Fertility and Sterility, 54(2): 206-10, 1990*

26. *C. M. A. Glazener, C. Coulson, P. A. Lambert, E. M. Watt, R. A. Hinton, N. G. Kelly & M. G. R. Hull, «Clomiphene treatment for women with unexplained* *infertility: placebo-controlled study of hormonal responses and conception rates», Gynecological Endocrinology, 4(2): 75-83, 1990*

***27.** Simantini S. Patankar et al., «Effect of Clomiphene Citrate on sperm density in male partners of infertile couples», Indian J Physiol Pharmacol, 51(2): 195-98, 2007*

***28**. Φραγκίσκος Ι. Χανιώτης, Δημήτριος Ι. Χανιώτης, «Φυσιολογία», Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, Αθήνα, 2009, ISBN: 978-960-372-1239*

***29**. Rogério de Barros F. Leão, Sandro C. Esteves, «Gonadotropin therapy in assisted reproduction: an evolutionary perspective from biologics to biotech», Clinics (Sao Paulo), 69(4):279-293, 2014*

***30.** The European Recombinant Human LH Study Group, «Recombinant human luteinizing hormone (LH) to support recombinant human follicle-stimulating hormone (FSH)-induced follicular development in LH- and FSH-deficient anovulatory women: a dose-finding study. The European Recombinant Human LH Study Group . » , J Clin Endocrinol Metab, 83(5):1507-14, 1998*

***31**. Antonio Pellicer et al., «Short and ultrashort protocols of GnRH agonist administration in assisted reproductive technologies», Infertility and Reproductive Medicine Clinics of North America, 12(1): 75-84, 2001*

***32.** Qiaohong Lai et al., «Comparison of the GnRH agonist and antagonist protocol on the same patients in assisted reproduction during controlled ovarian stimulation cycles», Int J Clin Exp Pathol, 6(9): 1903-10, 2013*

***33**. J M Wong et al., «Efficacy of nafarelin in assisted reproductive technology: a meta-analysis», Human Reproduction Update, 7(1): 92-101, 2001*

***34**. Chi-Hong Ho et al., « Prospective comparison of short and long GnRH agonist protocols using recombinant gonadotrophins for IVF/ICSI treatments», Reproductive BioMedicine Online, 16(5): 632-39, 2008*

***35** Hamed Youssef, M.D. et al., «GnRH agonist long protocol versus short protocol in women 40 years or more undergoing ICSI: a multicenter study», Middle East Fertility Society Journal, 13(1): 64-5, 2008*

36. *Raffaella Depalo et al., «GnRH agonist versus GnRH antagonist in in vitro fertilization and embryo transfer (IVF/ET)», Reprod Biol Endocrinol, 10: 26, 2012*

37. *Tarlatzis BC, Fauser BC, Kolibianakis EM, Diedrich K, Rombauts L, Devroey P., « GnRH antagonists in ovarian stimulation for IVF.», Hum Reprod Update, 12(4): 333-40, 2006*

38. *Deekshya Shrestha, Xiaolin La, Huai L. Feng, «Comparison of different stimulation protocols used in in vitro fertilization: a review», Ann Transl Med, 3(10): 137, 2015*

39. *Scott M. Hammond, «An overview of microRNAs», Adv Drug Deliv Rev, 87: 3–14, 2015*

40. *Van Wynsberghe PM et al., «Analysis of microRNA expression and function.», Methods Cell Biol, 106:219-252, 2011*

41. *Leigh-Ann MacFarlane, Paul R. Murphy, «MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer», Curr Genomics, 11(7): 537–561, 2010*

42. *Tesfaye D et al., «Potential role of microRNAs in mammalian female fertility.», Reprod Fertil Dev., 29(1): 8-23, doi: 10.1071/RD16266, 2016*

43. *Josep Marí-Alexandre et al., «miRNAs Regulation and Its Role as Biomarkers in Endometriosis», Int J Mol Sci., 17(1): 93, doi: 10.3390/ijms17010093, 2016*

44. *Anja Elaine Sørensen et al., «MicroRNAs Related to Polycystic Ovary Syndrome (PCOS)», Genes (Basel), 5(3): 684–708, doi: 10.3390/genes5030684, 2014*

45. *Charalampos Siristatidis et al., «MicroRNAs in Assisted Reproduction and their Potential Role in IVF Failure», In Vivo, 29(2): 169-175, 2015*

46. *E. Skourti et al. «MicroRNAs, cancer and cancer stem cells: From research to therapy», Archives of Hellenic Medicine, 30(4):391–405, 2013*

47. *Su JL et al., «Function and regulation of let-7 family microRNAs.», Microrna, 1(1):34-39, 2012*

48. *«What is C. elegans?», διαθέσιμο από* https://cbs.umn.edu/

49. *Hosuk Lee et al., «Biogenesis and regulation of the let-7 miRNAs and their functional implications», Protein Cell., 7(2): 100–113, doi: 10.1007/s13238-015-0212-y, 2016*

50. *Chadrashekar Kagepura Thammaiah, Shankar Jayaram, «Role of let-7 family microRNA in breast cancer», Non-coding RNA Research, 1(1): 77-82, 2016*

51. *Heather McGowan et al., «hsa-let-7c miRNA Regulates Synaptic and Neuronal Function in Human Neurons»,Front. Synaptic Neurosci., 10:19, doi: 10.3389/fnsyn.2018.00019, 2018*

52. *Irma Virant-Klun et al. «MicroRNAs: From Female Fertility, Germ Cells, and Stem Cells to Cancer in Humans», Stem Cells International, Article ID 3984937, http://dx.doi.org/10.1155/2016/3984937, 2016*

53. *Sydney Brenner, Jefferey H. Miller, «Encyclopedia of Genetics», Elsevier Science Inc., 2001, ISBN: 978-0-12-227080-2*

54. *Kooiker M, Xue GP, «cDNA library preparation.», Methods Mol Biol, 1099:29-40, 2014, doi: 10.1007/978-1-62703-715-0_5*

55. *Catherine H. Sterling et al., «An efficient and sensitive method for preparing cDNA libraries from scarce biological samples», Nucleic Acids Res., 43(1): e1, 2015, doi: 10.1093/nar/gku637*

56. *Mark A. Valasek, Joyce J. Repa, «The power of real-time PCR», Advances in Physiology Education, 29(3): 151-9, 2005, doi: 10.1152/advan.00019.*

57. *Karen Uhde et al., «MicroRNA Expression in Bovine Cumulus Cells in Relation to Oocyte Quality», Noncoding RNA, 3(1): 12, 2017, doi: 10.3390/ncrna3010012*

58. *Xian-Hong Tong et al., «Research Resources: Comparative MicroRNA Profiles in Human Corona Radiata Cells and Cumulus Oophorus Cells Detected by Next-Generation Small RNA Sequencing», PLoS One, 9(9): e106706, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0106706*

59. *Heather McGowan et al., «hsa-let-7c miRNA Regulates Synaptic and Neuronal Function in Human Neurons», Front Synaptic Neurosci., 10: 19, 2018, doi: 10.3389/fnsyn.2018.00019*

60. *Sabrina T. Reis et al., «The role of micro RNAs let7c, 100 and 218 expression and their target RAS, C-MYC, BUB1, RB, SMARCA5, LAMB3 and Ki-67 in prostate cancer», Clinics, 68(5):652, 2013, http://dx.doi.org/10.6061/clinics/2013(05)12*

61. *Tal Imbar, Iris Eisenberg, «Regulatory role of microRNAs in ovarian function», Fertility and Sterility, 101(6), 2014, http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.04.024*

62. *Wei Zhang, «Effects of let-7c on the proliferation of ovarian carcinoma cells by targeted regulation of CDC25a gene expression», Oncology Letters, 16(5): 5543-5550, 2018, https://doi.org/10.3892/ol.2018.9327*

63. *Dawit Tesfaye et al., «MicroRNAs: tiny molecules with a significant role in mammalian follicular and oocyte development», Reproduction, 155(3): 121-135, 2018, https://doi.org/10.1530/REP-17-0428*

64. *Cagdas Sahin et al., «microRNA Let-7b: A Novel treatment for endometriosis», Journal of Cellular and Moleclar Medicine, 22(11): 5346-5353, 2018, https://doi.org/10.1111/jcmm.13807*

65. *Kropp J, «Expression of microRNAs in bovine and human pre-implantation embryo culture media.», Front Genet, 5:91,2014, doi: 10.3389/fgene.2014.00091*